

THESIS

BONN

1969

ÜBER CHEMISCHE BINDUNGEN VON
TESTOSTERON-4-¹⁴C IM
SÄUGETIERORGANISMUS
IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN MIT KERN- UND
CYTOPLASMAFRAKTIONEN DER LEBER UND NIERE
UNREIFER RATTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
UWE LIPPERT
aus
AUSSIG

BONN 1969

ÜBER CHEMISCHE BINDUNGEN VON
TESTOSTERON-4-¹⁴C IM
SÄUGETIERORGANISMUS
IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN MIT KERN- UND
CYTOPLASMAFRAKTIONEN DER LEBER UND NIERE
UNREIFER RATTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
UWE LIPPERT
aus
AUSSIG

BONN 1969

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

Referent : Prof. Dr. rer. nat. Karl-Oskar Mosebach
Korreferent : Prof. Dr. Dr. W. Dirscherl

Tag der mündlichen Prüfung : 27. Juni 1969

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der
Universität Bonn

Direktor : Prof. Dr. Dr. W. Dirscherl

Druck : Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität
Bonn

1. Einleitung	1
2. Aufgabenstellung	2

3. Beschreibung des Gegenstandes	3
3.1. Beschreibung des Gegenstandes	3
3.2. Beschreibung des Gegenstandes	4
3.3. Beschreibung des Gegenstandes	5
3.4. Beschreibung des Gegenstandes	6
3.5. Beschreibung des Gegenstandes	7
3.6. Beschreibung des Gegenstandes	8
3.7. Beschreibung des Gegenstandes	9

4. Ergebnisse	10
4.1. Ergebnisse	10

5. Diskussion	11
5.1. Diskussion	11

6. Zusammenfassung	12
6.1. Zusammenfassung	12

7. Literaturverzeichnis	13
7.1. Literaturverzeichnis	13

8. Anlagen	14
8.1. Anlagen	14

9. Glossar	15
9.1. Glossar	15

10. Index	16
10.1. Index	16

11. Bibliographie	17
11.1. Bibliographie	17

12. Literaturverzeichnis	18
12.1. Literaturverzeichnis	18

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

<u>INHALTSÜBERSICHT</u>		<u>Seite</u>
<u>E I N L E I T U N G</u>		7
<u>T H E O R E T I S C H E R T E I L</u>		9
1	<u>Theorien über den Wirkungsmechanismus von Hormonen</u>	9
	a) Hormon als Enzym-Induktor	9
	b) Hormon als Enzym-Effektor	9
	c) Hormon als Coenzym	10
	d) Hormon als Permeabilitäts-Regulator	11
	e) Hormon als Gen-Aktivator	11
	f) Mögliche andere Wirkungsmechanismen	13
2	<u>Problemstellung</u>	14
<u>E X P E R I M E N T E L L E R T E I L</u>		16
I	<u>METHODIK</u>	16
1	<u>Allgemeiner Arbeitsplan und Schema der Zellfraktionierung</u>	16
2	<u>Trennung der Stoffgruppen</u>	
	(Material und spezielle Arbeitsmethoden)	18
	a) Tiere - Injektion - Sektion	18
	b) Zellfraktionierung	18
	c) Trennung der Proteide von den Lipiden	19
	d) Trennung der Nukleinsäuren von den Proteinen	20
	e) Trennung der DNS von der RNS	21
	f) Partielle Trennung der Mucopolysaccharide von den Proteinen	22
	g) Auftrennung der Lipide durch Dünnschicht- und Papier-Chromatographie	23
	h) Aufarbeitung der Proteine	30
	aa) Festigkeit der ^{14}C -Steroid-Bindungen	30
	bb) Enzymatische Hydrolysen und papier-chromatographische Auftrennung	31
	cc) Salzsäure Hydrolyse der ^{14}C -Steroid-bindenden Peptide; Bestimmung ihrer Aminosäure-Zus.	35
	dd) Säulen-chromatographische Auftrennung von Hydrolysaten (Sephadex G 25; Dowex 1X2)	35
	i) Isolierung der protein-gebundenen ^{14}C -Metabolite (Versuch ihrer Identifizierung)	38

3	<u>Mengen- und Radioaktivitätsbestimmungen</u>	44
a)	DNS- und RNS-Bestimmung durch Spektralphotometrie	44
aa)	Bestimmung der RNS durch die Orcin-Methode	44
bb)	Bestimmung der DNS durch die Diphenylamin-Meth.	45
b)	Radioaktivitätsbestimmungen	46
aa)	SIMON'sche Trockenverbrennung und Messung in Gasphase	46
bb)	Flüssig-Szintillations-Methode	49
cc)	Radio-Papierchromatographie	51
dd)	Radio-Dünnschichtchromatographie	52
II	<u>ERGEBNISSE und DISKUSSION</u>	53
1	<u>Übersicht über die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Stoffgruppen</u>	53
2	<u>Verteilung der Radioaktivität innerhalb der Lipidfraktion</u>	56
a)	Aktivitätsverteilung auf einem universellen Dünnschichtchromatogramm	57
b)	Weitere Auftrennung der Substanzen durch Radio-Papierchromatographie	59
c)	Versuche mit Doppelmarkierung	
aa)	Testosteron-4- ¹⁴ C und ³² P-Phosphat	65
bb)	Testosteron-4- ¹⁴ C und ³⁵ S-Sulfat	71
3	<u>Radioaktivität der Proteinfraktion</u>	73
a)	¹⁴ C-Steroid-Bindungen am Eiweiß aus Kernen und cytoplasmatischem Überstand	73
b)	Abtrennung ¹⁴ C-Steroid-bindender Peptide u. Aminos.	76
c)	Versuche zur Strukturaufklärung der ¹⁴ C-Steroid- -Bindungsorte am Eiweiß	83
d)	Säulen-chromatographische Untersuchung ¹⁴ C-Steroid- bindender Peptide und Aminosäuren	88
e)	Doppelmarkierung: Testosteron-4- ¹⁴ C und ³ H-Arginin	90
	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	97
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	101

E I N L E I T U N G

Bei keinem Hormon ist bisher der chemische Wirkungsmechanismus aufgeklärt worden. Zwar wurden mehrere Theorien aufgestellt, für die es auch Stützen gibt, doch beziehen sie sich immer nur auf spezielle Fälle.

Die zur Zeit am meisten diskutierten Theorien sind die eines unmittelbaren Einflusses auf das genetische Material des Zellkerns und die eines Einflusses auf die Permeabilität der Zellmembranen.

Am Physiologisch-Chemischen Institut in Bonn werden seit einigen Jahren Untersuchungen durchgeführt, um die Verteilung und Lokalisation von Steroidhormonen insbesondere von Testosteron im Säugetierorganismus kennenzulernen. Hierbei wurden zunächst Bindungen an histologische und cytologische Strukturen studiert (10,31,32,35,36). Es zeigte sich dabei, daß Testosteron (bzw. seine Metabolite) im Unterschied zu ähnlichen Untersuchungen mit Östrogenen bei allen Organen, auch bei den primären und accessoirischen Sexualorganen, vorzugsweise im Cytoplasmaraum und nur in geringem Umfang im Kern wiedergefunden wird. Hierbei konnte aber nicht erfaßt werden, wie groß derjenige Anteil des Hormons in den einzelnen Zellfraktionen ist, der Bindungen mit makromolekularen Substanzen eingegangen war. Wenn auch die Gesamtkonzentration im Kern wesentlich geringer ist, so muß doch damit gerechnet werden, daß das Steroid im Kern an bestimmte, physiologisch bedeutsame, chemische Substanzen stärker gebunden wird als an solche im Cytoplasmaraum.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen begonnen, die zum Ziel haben, Bindungen von Testosteron bzw. seinen Metaboliten an die chemischen Zellbausteine kennenzulernen. Ohne diese Kenntnis wird eine Klärung des Wirkungsmechanismus nicht möglich sein.

Für die Versuche wurden 30 Tage alte, männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Zur Aufarbeitung gelangten die Leber als Nicht-

erfolgsorgan sowie die Niere, die nach KOCHAKIAN in gewissem Umfang als Erfolgsorgan angesehen werden kann.

Wegen des grundlegenden Problems, ob das interessierende Hormon im Kern oder außerhalb desselben zu wirken beginnt, war es erforderlich, vor der chemischen Aufarbeitung eine Trennung in Kern- und Cytoplasmafraktion vorzunehmen.

Bei den hier referierten Versuchen wurden möglichst physiologische Bedingungen eingehalten. Hierunter sind zu verstehen:

In-vivo - anstelle von in-vitro - Versuchen, Verabreichung physiologischer Dosen sowie die Verwendung

unreifer Tiere anstelle von kastrierten (Vermeidung von Operationsschäden).

Die Forderung nach physiologischen Dosen machte den Einsatz von markiertem Hormon (Testosteron-4-¹⁴C) erforderlich. Zur Erfassung von Bindungspartnern des Testosterons bzw. seiner Metabolite wurden außerdem Doppelmarkierungs-Versuche durchgeführt:

¹⁴C-Testosteron und ³²P-Orthophosphat

¹⁴C-Testosteron und ³⁵S-Sulfat

¹⁴C-Testosteron und ³H-Arginin.

T H E O R E T I S C H E R T E I L

1 Theorien über den Wirkungsmechanismus von Hormonen

Einige Theorien über mögliche Mechanismen der Hormonwirkung seien im Folgenden kurz aufgeführt.

a) Hormon als Enzym-Induktor

KNOX und AUERBACH (22) bewiesen am Beispiel der Cortisonwirkung auf die Tryptophan-Pyrrolase der Rattenleber, daß die Aktivitätszunahme dieses Enzyms auf einer hormonbedingten Vermehrung der Enzymmoleküle d.h. auf einer Neusynthese beruht. Aus neuerer Zeit sind zu erwähnen die Arbeiten von WACKER über die Enzyminduktion bei Mikroorganismen durch Steroidhormone insbesondere durch Testosteron. *Streptomyces hydrogenans* reagierte nach Zusatz bestimmter Steroidhormone zum Nährmedium mit vermehrter Bildung der 20 β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase (vgl. auch HÜBENER, NESE-MANN, SCHMIDT-THOME: 17,38). Beim Stamm *Pseudomonas testosteroni* konnte die Synthese gleich dreier Enzyme durch einen hormonellen Induktor beobachtet werden (56).

Am Bonner Institut konnte OTTO (41) zeigen, daß Corticosteroide nicht nur die Aktivität bestimmter Transaminasen (z.B. Alanin-Transaminase), sondern auch deren stoffliche Menge in der Leber erhöht. Damit erwiesen sich die Corticosteroide ebenfalls als Enzym-Induktoren.

b) Hormon als Enzym-Effektor

Hier sei vor allem hingewiesen auf die Bedeutung der cyclischen Adenylsäure (3',5'-Adenyl-Monophosphat) für die Umwandlung der inaktiven Phosphorylase in die aktive Form (SUTHERLAND und RALL; 51). Es ist nahezu sicher bewiesen, daß die Hormone Glucagon und Adrenalin die Synthese des

cyclischen Adenylphosphates fördern.

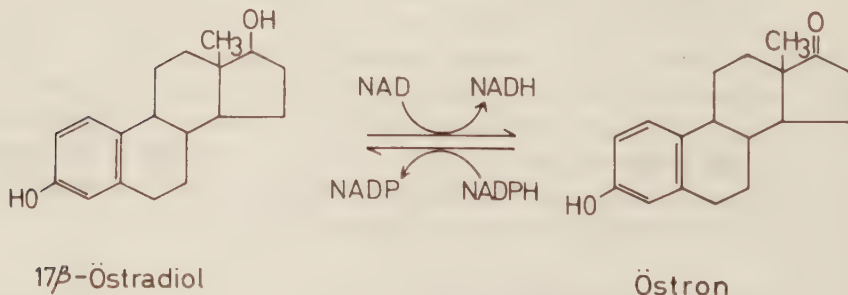
In jüngster Zeit wurde durch LANGAN (25) nachgewiesen, daß das cyclische Adenylphosphat die Synthese phosphorylierter Histone fördert und diese Reaktion durch bestimmte Hormone gefördert wird.

Andererseits sind Arbeiten bekannt geworden, die zeigen, daß durch Wirkstoffe, wahrscheinlich auch durch Hormone, unmittelbare Einflüsse auf die Aktivität zustande kommen. Erwähnt sei das Beispiel von TOMKINS und YIELDING (53) über eine Östrogenwirkung auf die Glutamatdehydrogenase, die eine Aufspaltung in Untereinheiten erfährt. Mit dieser Aufspaltung ist eine Verminderung der Enzymaktivität verbunden.

Übersichten über das Thema "Hormon als Enzym-Effektor" verdanken wir W. DIRSCHERL (11) und H. BREUER (5).

c) Hormon als Coenzym

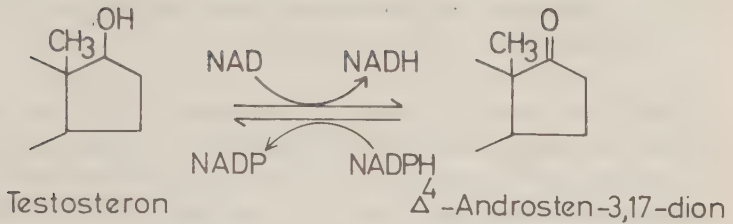
TALALAY und WILLIAMS-ASHMAN (52) schlossen aus der Beobachtung, daß 17β -Östradiol als Wasserstoffüberträger zwischen Pyridinnukleotiden (NAD und NADP) diene, daß Hormone direkt als Coenzyme fungieren könnten.



Eine solche Transhydrogenase-Funktion ließe sich auch anderen Steroid-Systemen zuordnen, z.B.:

Androst-4-en- 17β -ol-3-on

Androst-4-en-3,17-dion



Diese Theorie erscheint aus verschiedenen Gründen zweifelhaft und hat vor allem den Mangel, die Spezifität der Hormonwirkung unberücksichtigt zu lassen.

d) Hormon als Permeabilitäts-Regulator

Daß Hormone die Permeabilität von Zellmembranen und subzellulären Membranen beeinflussen und mit der damit verbundenen Änderung des Stoffaustausches eine Steuerung verschiedener Stoffwechselvorgänge erfolgt, ist zunächst für Peptidhormone nachgewiesen worden. LEVINE und GOLDSTEIN(27) führten die Glucoseaufnahme der Muskelzelle nach Insulingabe hierauf zurück.

Auch für Steroidhormone kommt ein ähnlicher Mechanismus in Frage. Diese Ansicht wird gestützt durch Beobachtungen von KROEGER (24) an Insekten-Speicheldrüsenchromosomen. Isolierte Chromosomen reagierten auf eine Erhöhung der K^+ -Konzentration in gleicher Weise wie die Chromosomen intakter Zellen nach Behandlung mit dem Steroidhormon Ecdyson.

e) Hormon als Gen-Aktivator

Diese erstmals am Beispiel des Ecdysons (Insekten-Verpupphormon) zu Ende diskutierte Theorie zählt zur Zeit zu den interessantesten Versionen, zumal in Verbindung mit der JACOB-MOND'schen Theorie (18) über die Repressorwirkung auf die Gen-Aktivität.

Um die eventuell hormonelle Steuerung der genabhängigen Re-

aktionsabläufe verständlich zu machen, sei kurz auf die zur Zeit gültige Vorstellung über den Mechanismus der Proteinbiosynthese eingegangen:

Die genetische Information, bestimmend für die Sequenz der Aminosäuren in der Polypeptidkette, ist durch Trinukleotidsequenzen (Triplets) in der Desoxyribonukleinsäure (DNS) des Zellkerns präformiert. Jeder Aminosäure ist ein charakteristisches Basen-Triplet zugeordnet. Die Reihenfolge der Aminosäuren ist somit gegeben durch die Sequenz dieser Triplets. Eine Übertragung der Information auf den Cytoplasma-raum erfolgt durch die von der Ribonukleinsäure-Polymerase (diese selbst wieder DNS-abhängig) gebildeten Messenger-RNS (m-RNS), welche ihrer Matrizen-DNS spiegelbildlich gleicht. Die m-RNS bindet sich nach Verlassen des Zellkerns an die Ribosomen des Cytoplasmas unter Bildung von Polysomen. An diesen RNS-Komplexen vollzieht sich die Proteinsynthese, indem jeweils eine bestimmte Aminosäure, verkoppelt mit einer spezifischen Transfer-RNS (t-RNS, charakterisiert durch ihr passendes Basen-Triplet), an den ihr zukommenden Platz am Polysom transportiert und hier in die Peptidkette eingebaut wird.

Die in der DNS gespeicherte Information wird nach JACOB u. MONOD (18) normalerweise durch sog. Repressoren zurückgehalten. Hierunter hat man sich spezifische Proteine bzw. Verbindungen vorzustellen, die sich zusammensetzen aus dem von einem übergeordneten Regulator-Gen gebildeten und in das Cytoplasma abgegebenen Gen-Produkt und dem sog. Effektor, einem im Cytoplasma unter Enzymwirkung entstandenen Spaltprodukt. Die Repressoren unterdrücken nach Rückkehr in den Kern durch chemische oder physikalische Bindung die Aktivität eines bestimmten DNS-Abschnittes, des Operators, und blockieren damit die m-RNS-Synthese des Operator-abhängigen Struktur-Gens.

Würde durch Einwirkung eines Induktors, etwa eines Hormons, der Repressor in seinen physikalisch-chemischen Eigenschaf-

ten verändert, so könnte das von ihm blockierte Operator-Gen wieder das bzw. die zugehörigen Struktur-Gene zu einer Proteinsynthese nach obigem Schema veranlassen.

Als ersten sichtbaren Effekt einer hormonellen Gen-Aktivierung beschrieb CLEVER (8) das nach Ecdysongabe auftretende Phänomen der "Puff"-Bildung an Speicheldrüsen-Chromosomen von *Chironomus tentans*. Es handelt sich dabei um Auftreibungen an bestimmten, aktivierten Stellen der Chromosomen, hervorgerufen durch die hier ausgelöste m-RNS-Synthese.

Die Vorstellung, daß Hormone als Genaktivatoren wirken, ist aufs engste verbunden mit der Vorstellung einer Hormonwirkung als Enzym-Induktion.

f) Mögliche andere Wirkungsmechanismen

Bei genauer Prüfung der vorgeschlagenen Wirkungsmechanismen von Hormonen erscheinen heute drei Theorien von übergeordneter Bedeutung:

Einfluß auf die Gen-Aktivität

Einfluß auf die Enzym-Aktivität

Einfluß auf die Permeabilität.

Es muß betont werden, daß es keineswegs sicher ist, ob eine dieser Theorien oder auch eine Kombination mehrerer ausreicht, um die Chemie der Hormonwirkung zu erklären. Es gibt sogar Anhaltspunkte dafür, daß der Mechanismus auch bezüglich der Nukleinsäure- und Proteinsynthese ein völlig anderer ist, etwa indem die Stabilität der m-RNS oder ihre Affinität zur ribosomalen RNS beeinflußt wird. Nach neueren Ergebnissen von VILLEE und FUJII (55) wird möglicherweise nicht primär die Synthese der m-RNS im Kern gefördert (KARLSON, 20), sondern vielmehr die der t-RNS. Es wurde beobachtet, daß 1/2 Stunde nach Injektion von Testosteron in unreife Ratten (3 Wochen alt) vornehmlich der Einbau radioaktiven Phosphates in die t-RNS erfolgt.

Durch Arbeiten von KOCHAKIAN (23) ist sichergestellt, daß Testosteron eine Vermehrung der RNS in den accessorischen Sexualorganen bedingt. Die Untersuchungen von WILLIAMS-ASHMAN (58) zeigen, daß Ribosomen der Prostata Testosteron-behandelter Tiere eine höhere m-RNS-Konzentration besitzen als die unbehandelten Tiere. Durch MOSEBACH und ENGELS (34) wurde gefunden, daß die DNS-Synthese bzw. der Einbau markierten Thymidins in die Kern-DNS von Vesikular-drüsen der Ratten relativ schnell durch Testosteron gefördert wird. Vor kurzem wurde sowohl für Östrogene als auch für Androgene nachgewiesen, daß ihre Wirkungen auch durch solche RNS erzielt werden kann, die unter dem Einfluß der genannten Hormone in den entsprechenden Erfolgsorganen entstanden ist.

2 Problemstellung

Es sei am Beispiel des Testosterons noch einmal hervorgehoben, daß zwar einige morphologische Angriffspunkte und physiologische Wirkungen gesichert sind, z.B.:

- A) proteinanabole Wirkung, speziell an den accessorischen Sexualorganen,
- B) hemmender Einfluß auf die Ausschüttung von Gonadotropinen als Folge eines primären Angriffs im Hypothalamus und
- C) unmittelbare Förderung der Spermiogenese im Keimepithel
(TONUTTI, 54),
daß aber bis heute der chemische Wirkungsmechanismus nicht geklärt werden konnte.

Wenn auch durch viele Hormone einschließlich Testosteron die Nukleinsäure-Synthese in Erfolgsorganen schon während der ersten Stunde nach Applikation gefördert wird, so bleibt doch die Frage offen, ob diese Syntheseförderung Folge unmittelbarer Bindung des Hormons am Syntheseort oder bereits Folge eines diesem Stoffwechselvorgang noch vorgelagerten, primären Effektes ist. Die Vermehrung der Messenger- und Transfer-RNS könnte also bereits ein sekundäres Phänomen sein.

Am Bonner Institut für Physiologische Chemie wird diese Frage am Beispiel des Testosterons seit einigen Jahren studiert (32, 36). Dabei stellte sich im Unterschied zu Östrogenen am Uterus immer wieder heraus, daß Testosteron nicht bevorzugt vom Kern sondern vom Cytoplasma aufgenommen wird (Kern 20% - Cytoplasma 80%).

Bei diesen Experimenten wurde allerdings noch nicht die Verteilung auf stoffliche Bestandteile der Zellen und Gewebe, sondern, wie schon in der Einleitung erwähnt, auf cytologische und histologische Strukturen untersucht. Es wurde daher notwendig, nun auch

das Studium der Bindungen an die chemischen Zellbausteine in Angriff zu nehmen.

Bindungen von Testosteron an chemische Strukturen sind bisher fast ausschließlich bei Blutplasma-Bestandteilen untersucht worden (2,26,16,42,29,44), nicht aber an Organbausteinen, weder im Kern noch im Cytoplasmabereich.

Arbeiten von OERTEL (40), der über Bindungen von Androgenen (bes. Dehydro-epi-Androsteron) an Phosphatide im Blutplasma berichtete, lassen es für möglich erscheinen, daß Testosteron auch von den Phosphatid-haltigen inneren und äußeren Zellmembranen gebunden wird und dabei physiologische Bedeutung etwa im Sinne einer Permeabilitätsänderung erlangt.

EXPERIMENTELLER TEILI METHODIK1 Allgemeiner Arbeitsplan u. Schema der Zellfraktionierung

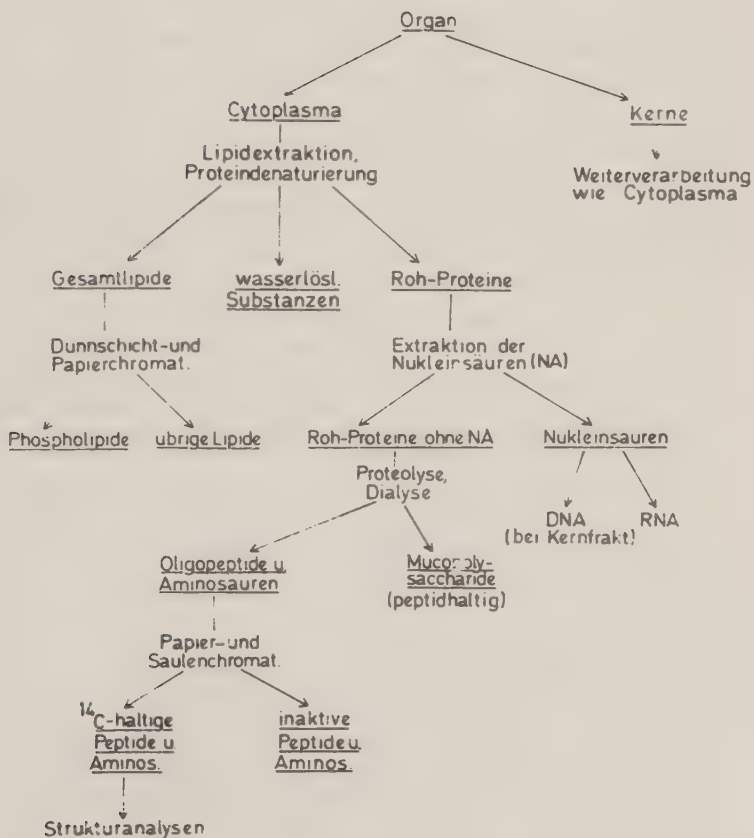
Zur Aufarbeitung gelangten die Leber und die Nieren unreifer (30 Tage alter), männlicher Ratten 10 Minuten bzw. 3 Stunden nach intraperitonealer Injektion von Testosteron. Es konnten somit zwei Organe miteinander verglichen werden, von denen das eine als Nichterfolgsorgan (Leber), das andere (Niere) bedingt als Erfolgsorgan angesehen werden kann. Auf eine Verwendung der Vesikulardrüsen wurde wegen der Kleinheit der Organe zunächst verzichtet.

Eine der entscheidendsten Fragen bei der Suche nach dem primären Wirkungsort eines Hormons ist die, ob primäre Bindungen innerhalb oder außerhalb der Zellkerne von Erfolgsorganen zustande kommen.

Vor der stofflichen Trennung wurden daher die Organgewebe in eine Kernfraktion und eine rohe Cytoplasmafraktion zerlegt. Danach erfolgte die Auftrennung in Proteine, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Mucopolysaccharide und verschiedene Gruppen der Lipide.

Bei der Aufarbeitung wurde die Verwendung von Säuren und Basen möglichst vermieden. Wenn auch nicht damit gerechnet werden konnte, daß bei dem im Folgenden beschriebenen Trennungsgang lockere Bindungen geschont blieben, so war doch wenigstens die Erhaltung fester chemischer Bindungen gewährleistet.

Nachstehendes Schema gibt eine Übersicht über den
Aufarbeitungsgang:



2 Trennung der Stoffgruppen

(Material und spezielle Arbeitsmethoden)

a) Tiermaterial - Injektion - Sektion

Als Versuchstiere wurden unreife, männliche Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 30 Tagen mit einem Gewicht von 50 bis 70 g verwendet. Eine Vorbehandlung fand nicht statt. Wasser und Standardfutter wurden ad libidum verabreicht. Die injizierten Hormonmengen betrugen 50 und 100 μc bzw. in einem Fall 300 μc entsprechend 0.5, 1.0 und 3.0 mg (The Radiochemical Centre, Amersham, England; Amp. zu 0.1 mc = 29,2 mc/mM in Benzol gelöst). Nach Verdunstung des Lösungsmittels im Stickstoffstrom erfolgte die Lösung des Hormons in einem definierten Volumen (meist 0,4 ml) einer Mischung aus 1,2-Propylenglykol und Wasser 1:1. Die Testosteronlösung wurde intraperitoneal injiziert.

Bei je einem Versuch wurden zusätzlich radioaktives Phosphat bzw. Sulfat bzw. Arginin eingesetzt (^{32}P -Orthophosphat 2 mCi/ml, ^{35}S - Na_2 -Sulfat 1 mCi/ml, Fa. Buchler & Co., Braunschweig; ^3H -Arginin-HCl 1.8 mc/mg, The Radiochemical Centre, Amersham, England).

Nach 10 oder 180 Minuten wurden die Tiere in Äthernarkose dekapitiert, sezziert und die in dieser Arbeit interessierenden Organe, Leber und Nieren, entnommen.

b) Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung wurde nach ALLFREY (1) in 0.5m- und 0.25m-Rohrzuckerlösung durchgeführt, da bei der mit organischen Lösungsmitteln arbeitenden BEHRENS-Methode (4) die interessierenden Steroide herausgelöst worden waren.

Die Organe (Frischgewicht bei Leber 1 bis 3 g, bei Nieren 0,8 bis 1 g) wurden unter Kühlung grob zerkleinert und nach Zusatz von je 1 ml 0.5m- sowie anschließend 8 ml 0.25m-Saccharoselösung (enth. 0.0033m CaCl_2) ca. 1 Minute homogenisiert (Homogenisator nach Potter-Elvehjem, Fa. Braun -

Melungen). Um unzerkleinerte Bindegewebsstränge zu entfernen, wurde das Homogenat mittels Saugvorrichtung durch Perlongaze filtriert. In verschraubbaren Plastik-Zentrifugenröhrchen, die nach Einbringen des Homogenates mit 0.25m Saccharoselösung aufgefüllt wurden, konnte nach 8-minütigem Zentrifugieren (Präp. Ultrazentrifuge, WKf Ernsthoven) bei etwa 4000 U/min entspr. ca. 1000 g die Kernfraktion vom cytoplasmatischen Überstand getrennt werden. Letzterer wurde sofort dekantiert. Die Kerne enthielten noch eine gut abgegrenzte Erythrozytenfraktion, die nahezu quantitativ mit einem Spatel entfernt werden konnte. Nach zweimaligem Waschen der Kerne mit 0.25m Rohruckerlösung und Zentrifugation blieb der Überstand klar. Die Waschflüssigkeiten wurden verworfen. Auf jede weitere Reinigung der Kerne mit wäßrigen oder organischen Lösungsmitteln wurde bewußt verzichtet, um eine eventuelle Extraktion von kern-eigenem, steroidhaltigen Material zu vermeiden. Alle diese Arbeitsvorgänge erfolgten unter Kühlung bei 0° bis + 4°. Die Kerne wurden in 10 ml H₂O aufgeschlämmt und in gleicher Weise wie die Cytoplasmafraktion weiterbehandelt.

c) Trennung der Proteide von den Lipiden

Die Abtrennung der Lipide und die gleichzeitige Denaturierung der Proteine bzw. der Proteide erfolgte ausschließlich mit organischen Lösungsmitteln. Den Kern- und Cytoplasmafraktionen von Leber und Niere wurden je 100 ml einer 2:1-Mischung von Isopropylalkohol und Äther zugesetzt. Die auftretende Trübung zeigte die Ausfällung der denaturierten Eiweiße sowie der Nukleo- und Mucoproteide an. Um eine quantitative Lipid-Extraktion zu erzielen, wurde in verschlossenen Rundkolben 12 Stunden bei Zimmertemperatur auf einer Schüttelmaschine digeriert. Bei den Cytoplasmafraktionen schied sich der Rohrucker der Zentrifugierlösung an der Glaswand ab. Durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 3000 U/min ließen sich die ausgefällten Substanzen ab-

trennen. Nach Dekantieren des Lipidüberstandes wurde dieser Bodensatz noch sechsmal mit folgenden organischen Lösungsmitteln (je 10 ml) nachextrahiert, um eventuell noch anhaftende freie Lipide insbesondere noch extrahierbare ^{14}C -Aktivität quantitativ zu entfernen:

Isopropanol (2x); Äthanol (1x); Chloroform/Äther 2:1 (2x)
Äthanol 96 % (1x).

Sämtliche Extrakte wurden vereinigt und die organischen Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei ca. 40° abgedampft. Jeder Lipidextrakt wurde in einem definierten Volumen Chloroform (10 bzw. 30 ml) aufgenommen und die Radioaktivität eines Aliquots (0,1 - 0,5 ml) mit dem Flüssig-Szintillations-Spektrometer (FSS: Tri-Carb-Counter, vgl. S. 49) ermittelt. Nach erneutem Abdampfen erfolgte nunmehr die Lösung der Lipide für die dünn-schicht-chromatographische Auftrennung in jeweils so viel Chloroform, daß die Radioaktivität in 0,1 ml 10 000 bzw. 40 000 dpm betrug.

d) Trennung der Nukleinsäuren von den Proteinen

Die Proteide enthielten noch die Nukleinsäuren, Mucopolysaccharide und einige organische und anorganische Substanzen. Die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgte in Anlehnung an FERGUSON und WOOL (13).

Die lipidextrahierten Proteide wurden mit 10 proz. NaCl unter Rückflußkühlung 30 Minuten bei 100° gekocht. Hierbei werden durch Cl⁻-Ionen die Nukleinsäuren von den Trägerproteinen (Histonen) abgespalten. Unter pH-Kontrolle mittels Phenolrot (je 2 Tr. einer 0,02 proz. Lsg. pro 5 ml) ließ sich durch zeitweiliges Zutropfen von 0,1n-NaOH eine nahezu neutrale Reaktion aufrecht erhalten, so daß die freiwerdenden Nukleinsäuren in Lösung gehalten und vor einer eventuellen Hydrolyse geschützt wurden. Nach Abkühlung und Zentrifugation konnte der Überstand dekantiert und eine erneute Kochsalzextraktion vorgenommen werden. Die vereinigten Überstände enthielten die Nukleinsäuren quantitativ. Eine in einem Fall durchgeführte dritte Extraktion, die getrennt untersucht wurde, zeigte keinen

meßbaren Gehalt an Nukleinsäuren: Die Farbreaktion mit Orcin (s.S. 44) verlief negativ.

Unter Zusatz von 96 proz., auf -10° abgekühltem Äthanol (25 ml pro 10 ml Extraktionslösung) trat feinflockige Ausfällung der Nukleinsäuren ein, die durch 12-stündiges Stehenlassen bei -10° quantitativ verlief.

Die Nukleinsäuren wurden abzentrifugiert (5 Min. bei 3000 U/min) und nochmals mit 2 ml Alkohol 96 % nachgewaschen. Überstand und Waschflüssigkeit wurden verworfen. Nach Trocknung ließen sich die Nukleinsäuren durch Zupipettieren von 3 ml 0,1n Natronlauge in Lösung bringen.

Für die Auftrennung in DNS und RNS wurden im allgemeinen 2 ml benötigt, für die Radioaktivitätsbestimmung im Flüssig-Szintillations-Spektrometer 0,5 ml.

e) Trennung der DNS von der RNS

In Anlehnung an SCHMIDT und THANNHAUSER (46) ließen sich die in 0,1n-NaOH gelösten Nukleinsäuren unter Verseifung der RNS durch 24-stündiges Erwärmen auf 37° trennen. Nach Abkühlung auf ca. 0° konnte bei den Kernfraktionen die DNS durch Zupipettieren von 0,2 ml 2n-HCl ausgefällt werden. Sie wurde abzentrifugiert und die im Überstand enthaltene, hydrolysierte RNS dekantiert.

Die Tatsache, daß nach HCl-Zugabe bei den Cytoplasmafraktionen niemals DNS ausfiel, bewies die Vollständigkeit der Kernabtrennung durch Ultrazentrifugation. (Mitochondriale DNS konnte mit dieser Methode nicht erfaßt werden).

Die ausgefällte DNS, mit 1 ml 0,2n-HCl nachgewaschen, löste sich in 2 ml 0,01n-NaOH. Die RNS-Lösungen wurden ebenfalls auf ein Volumen von je 2 ml gebracht. Mit Anteilen erfolgten die Radioaktivitätsmessung im Flüssig-Szintillations-Spektrometer (s.S. 50) sowie die spektralphotometrische Mengenbestimmung (s.S. 44).

f) Partielle Trennung d. Mucopolysaccharide von den Proteinen

Da bei der Isolierung der Mucopolysaccharide wegen der eventuell vorliegenden ^{14}C -Steroid-Bindungen auf jede Anwendung von Alkalien und Säuren verzichtet werden sollte, bot sich der enzymatische Abbau der Proteine als geeigneter Weg an. In Anlehnung an SCOTT (48) wurde zunächst mit Papain (0,05 %) in einer Digestionslösung bestehend aus 0,1m-Phosphat-Puffer pH 6,9 unter Zusatz von 0,005m Cystein-HCl und 0,005m Versene (Na_2 -Äthylendiamintetraazetat) bei 65° 24 Stunden hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde dialysiert, im Vakuum eingengt und das rohe Mucopolysaccharidgemisch mit Alkohol ausgefällt.

Da sich aber der Abbau der Proteine als unzureichend erwies, wurden alle späteren enzymatischen Hydrolysen ausschließlich mit dem Präparat "Pronase" (39), einem proteolytischen Ferment aus *Streptomyces griseus*, durchgeführt. Die Mucopolysaccharid-haltigen Eiweiße (10, 20, 50 oder 100 mg) wurden im Verhältnis 100:1 mit diesem Ferment in 2 bis 10 ml 0,05m Natriumphosphat-Puffer pH 7,4 (enth. 0,005m Titriplex III als Protektor gegenüber hemmenden Schwermetallionen) für 24 bzw. 48 Stunden bei 40° digeriert. Der Zusatz von 0,1 ml Toluol schützte vor event. Einfluß von Mikroorganismen. Die Lösung des Hydrolysates wurde in Visking-Schläuchen 15 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert. Dabei konnten Aminosäuren und Peptide sowie Salze abgetrennt werden. Die noch verbliebenen Schwebeteilchen wurden abzentrifugiert. Der klare Überstand enthielt rohe Mucopolysaccharide, die nach Einengung der Lösung am Rotationsverdampfer und anschließendem Alkoholzusatz (98 %) als weiße Flocken ausfielen. Nach dem Abzentrifugieren wurden sie nochmals mit Alkohol nachgewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Ihr Radioaktivitätsgehalt konnte nach der Auswaage durch die Trockenverbrennung nach SIMON (49) in Gasphase bestimmt werden (s.S. 46).

g) Auftrennung der Lipide durch Dünnschicht- und Papier-
-Chromatographie

Die Auftrennung der Lipidextrakte aus den Kern- und Cytoplasmafraktionen von Leber und Niere erfolgte zunächst durch Dünnschicht-Chromatographie. Nach vorheriger Bestimmung des Radioaktivitätsgehaltes (s.S. 20) wurden die Lipidrückstände in so viel CHCl_3 gelöst, daß 0,1 ml eine Aktivität von ca. 10 000 dpm (in einigen Fällen auch 40 000 dpm) enthielten. Es wurden 20 x 20 cm Trägerplatten benutzt, deren 0,25 mm - Beschichtung (Kieselgel G nach Stahl) durch 30-minütiges Erhitzen bei 105° aktiviert und mit 1,2-Dichloräthan/Methanol (98:2) vorgereinigt worden war. Von jedem Lipidextrakt wurden je 0,1 ml auf zwei Dünnschichtplatten aufgetragen. Auf der einen wurden als Standards Testosteron,

5 β -Androstan-3 α -17 β -diol,

5 β -Androstan-3 α -ol-17-on,

Androst-4-en-3,17-dion,

5 α -Androstan-3,17-dion,

5 α -Androstan-3 α -ol-17-on

mitchromatographiert, auf der zweiten Dünnschichtplatte anfangs regelmäßig, später sporadisch folgende Lipidstandards (jeweils 10 μ l mit 30 μ g):

Lecithin,

Sphingomyelin,

Phosphatidyl-Serin,

Phosphatidyl-Inosit,

Palmitinsäure,

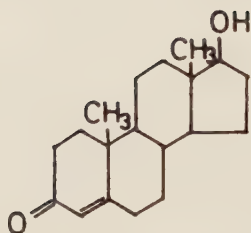
Glycerin-Dipalmitat,

Cholesterin,

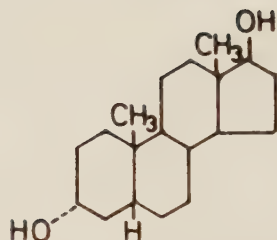
Cholesterin-Palmitat,

Tristearat.

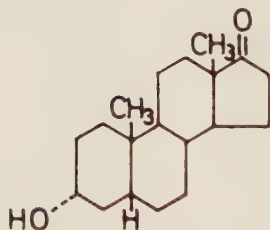
Die eingesetzten Steroid-Standards (vgl. Formelsammlung S. 24) repräsentieren die bekanntesten Testosteron-Metabolite. Die Lipidstandards umspannen Lipidgruppen verschiedener Polarität.



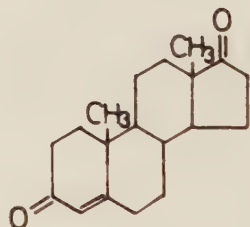
Androst-4-en-17 β -ol-3-on
(Testosteron)



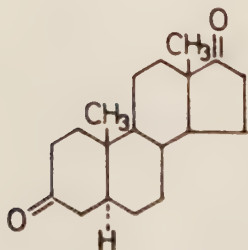
5 β -Androstan-3 α -17 β -diol



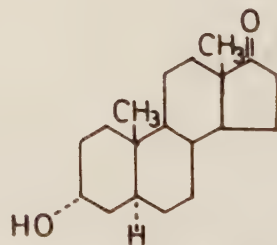
5 β -Androstan-3 α -ol-17-on



Androst-4-en-3,17-dion



5 α -Androstan-3,17-dion



5 α -Androstan-3 α -ol-17-on
(Androsteron)

Die Entwicklung der Dünnschicht-Chromatogramme erfolgte stufenweise in drei Systemen (19). Es wurden daher, um den rechtzeitigen Wechsel des Systems vornehmen zu können, drei Markierungen in einem Abstand von 8 cm, 10,5 cm und 17 cm von der Startlinie eingeritzt.

1. System: n-Propanol/ NH_4OH (12,5 %) 80:20; der Chromatographievorgang wurde unterbrochen, als die Lösungsmittelfront nach ca. 1 Stunde die erste Markierung bei 8 cm erreicht hatte. Nach Zwischentrocknung mit Kaltluft erfolgte die Weiterentwicklung im
2. System: 1,2-Dichloräthan/Methanol (98:2), bis nach ca. 1 1/2 Stunde die Front bei der 17 cm - Marke stand; Zwischentrocknung;
3. System: Chloroform/Eisessig (95:5); nach ca. 75 Min., als die Front die 10,5 cm - Marke erreichte, wurde die Chromatographie abgebrochen; Trocknung bei Zimmertemperatur.

Die Lage der Standardsubstanzen ließ sich unter Aussparung der Lipidextraktbahnen (Abdecken mit Glasplatte) durch Farbreaktionen fixieren.

Bei den Steroidhormon-Standards trat nach Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagens (2,5 ml abs. Alk. + 10 ml conc. H_2SO_4 + 125 mg Vanillin) und anschließendem 10-min. Erhitzen bei 105° Blauviolett-Färbung auf (vgl. Abb. 1 A S. 26). Die Lipid-Standards konnten durch Besprühen mit Bromthymolblau-Reagens (50 mg Bromthymolblau + 1,25 mg Borsäure + 8 ml n-NaOH + 112 ml H_2O) und anschließender 10-min. Behandlung in einer gesättigten NH_3 -Atmosphäre als gelbe Flecke auf blauvioletterm Grund dargestellt werden (vgl. Abb. 1 B S. 27).

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung bei besonders interessierenden Lipoidgruppen wurden die Chromatogramme der Lipidextrakte in 4 Bereiche unterteilt: (S.27)

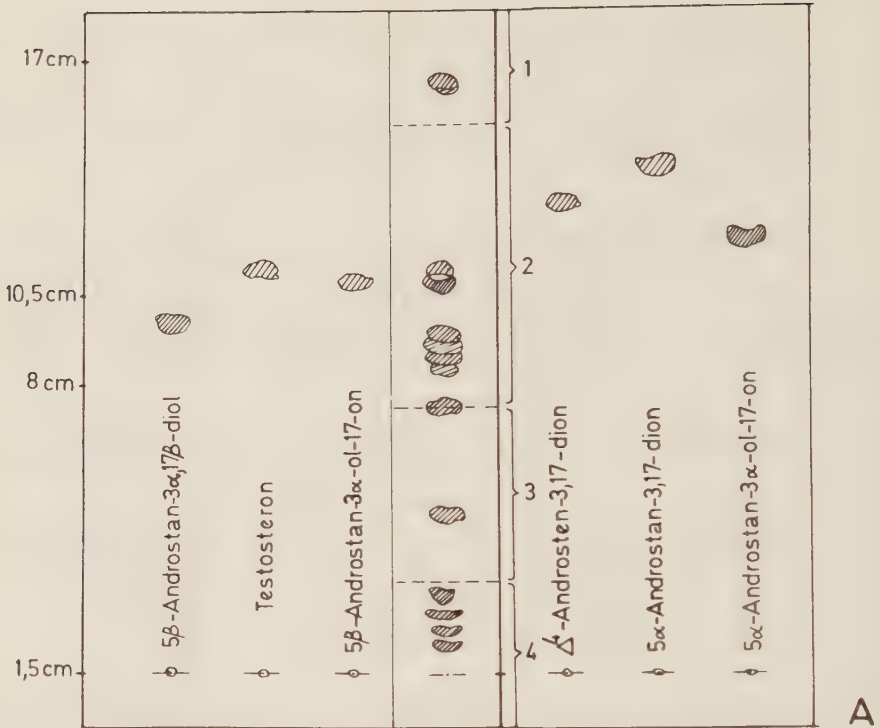


Abb. 1 Dünnschicht-Chromatogramme der Lipidstandards zum Studium der Verteilung und der Bindungen von ^{14}C -Testosteron-Metaboliten in den extrahierbaren Lipidfraktionen;

A: Androstan-Derivate (Vanillin-Schwefelsäure)

B: Sterine, Fette u. Phosphatide (Bromthymolblau);

Kieselgel G nach Stahl; Entwicklung im 3-stufigen

System (s.S. 25): 1. n-Propanol/ NH_4OH (12,5 %) 80:20

2. 1,2-Dichloräthan/Methanol 98:2

3. Chloroform/Eisessig 95:5

Bereich 1: Lipide, weniger polar als $5\alpha(\beta)$ -Androstan-3,17-dion,

Bereich 2: C_{19} -Steroide mit 2 O-Atomen,

Bereich 3: C_{19} -Steroide mit 3 (und mehr?) O-Atomen sowie C_{19} -Steroid-Konjugate,

Bereich 4: Phosphatide.

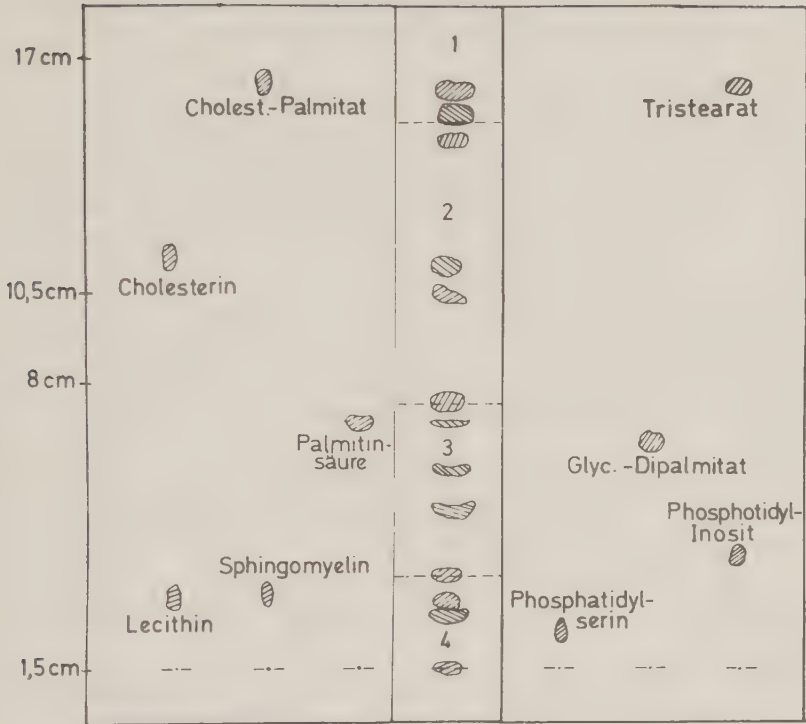


Abb. 1 B: Text siehe unter Abb. 1, S. 26

Bereich 1: 17 cm bis ca. 15 cm; unpolare Substanzen bzw. Substanzen, weniger polar als $5\alpha(\beta)$ -Androstan-3,17-dion

Bereich 2: 15 cm bis ca. 8 cm; Testosteron und Metabolite zwischen 5β -Androstan-3 α -17 β -diol und $5\alpha(\beta)$ -Androstan-3,17-dion

Bereich 3: 8 cm bis ca. 2 cm; Konjugate von Testosteron und seinen Metaboliten sowie freie Testosteronmetabolite mit 3 und mehr Sauerstofffunktionen

Bereich 4: 2 cm bis zur Startlinie; Phosphatide

Die Radioaktivitätsmessung erfolgte mit dem Dünnschicht-Scanner von Prof. Dr. Berthold (Wildbad), s. S. 52.

Das Sorptionsgel der 4 Bereiche wurde einzeln von der Trägerplatte abgetragen und in einer Fritte 3G2 gesammelt. Die adsorbierten Substanzen konnten mit dem Lösungsmittelsystem Benzol/Methanol/Chloroform quantitativ eluiert werden. Nach dem Abdampfen wurden die Lipoidfraktionen (4 Fraktionen aus Kernen sowie 4 aus Cytoplasma sowohl von Leber- als auch von Nierenzellen d.h. 16 Lipoidfraktionen pro Versuch) in je 0,2 ml Chloroform gelöst und eine weitere Auftrennung in verschiedenen papierchromatographischen Systemen vorgenommen (vgl. Abb. 8, S. 60-61).

Auf jedem Papierchromatogramm wurden zwei Hauptbahnen mit je 100 μ l Lipidextrakt beschickt. Gemäß den Vorschriften von BUSH (6) fand hierbei Whatman 1 und 2 - Papier Anwendung, nachdem es in der Soxhlet-Apparatur mit Benzol - Methanol 1:1 während 24 Stunden vorgereinigt worden war.

Die Substanzen des Bereiches 1 wurden rechromatographiert im System (3) : Butan (1,3)diol - Methylcyclohexan 1:5, absteigend, 3.5 Stdn., Whatman 1 (zuvor in Butan(1,3)diol/Methanol 1:3 imprägniert und bis auf eine geringe Restfeuchte luftgetrocknet).

Die Substanzen des Bereiches 2 wurden rechromatographiert im System (30) : n-Heptan/Benzol/Methanol/Wasser 67:33:80:20, abst., 3.5 Stdn., Whatman 2.

Die Substanzen des Bereiches 3 wurden rechromatographiert im System (47) : Äthylazetat/Toluol/n-Hexan/III-Butylalk./Eisessig/Wasser 60:75:40:25:60:140, abst., 3.5 Stdn., Whatman 2.

Die Substanzen des Bereiches 4 wurden rechromatographiert im System (47) : Äthylazetat/n-Butanol/Ammoniak/Wasser 9:1:1:9, abst., Whatman 2.

Auf der einen Hauptbahn der entwickelten Chromatogramme wurde die Lage der radioaktiven "Peaks" bestimmt, anfangs mit dem Radio-Papierchromatographen (Fieseke u. Hoepfner) bzw. dem für radiopapierchromatographische Zwecke umgebauten Dünnschicht-Scanner (Prof. Berthold, s.S. 51), später stets mit dem wesentlich empfindlicheren Flüssig-Szintillations-Spektrometer (FSS, s.S. 50).

Der Einsatz des FSS erleichterte auch die Auswertung eines Versuches mit Doppelmarkierung (vgl. S. 65), bei dem nebeneinander ^{14}C -Testosteron und ^{32}P -Phosphat eingesetzt wurden. Die durch jeweils zwei bewegliche Diskriminatoren bestimmten Kanäle konnten auf die entsprechenden Energie-maxima getrennt eingestellt werden. Es war somit möglich, radioaktive "Peaks" mit gemeinsamer ^{14}C - und ^{32}P -Aktivität differenziert auszumessen.

Ein weiterer Doppelmarkierungs-Versuch, bei dem wie beim ^{32}P -Versuch hauptsächlich die Lipidfraktion interessierte, wurde mit ^{14}C -Testosteron und ^{35}S -Sulfat durchgeführt. Hierbei war eine getrennte Kanaleinstellung wegen der gleichen mittleren Energie der Nuklide nicht möglich, so daß erst am Abfall der Aktivität (Halbwertszeit $^{35}\text{S} = 87 \text{ d}$) das Vorliegen radioaktiver Schwefelverbindungen erkannt werden konnte.

Bei den nach dünn-schicht- und papierchromatographischer Auftrennung erhaltenen radioaktiven "Peaks" interessierten vor allem jene chemischen Substanzen, die zu einer relativ festen Bindung mit ^{14}C -Steroiden befähigt waren. Es wurde versucht, durch successive Hydrolysen die Struktureinheiten zu finden, die an einer Bindung von Testosteron bzw. seiner Metabolite beteiligt sind (s.S. 67).

h) Aufarbeitung der Proteineaa) Festigkeit der ^{14}C -Steroid-Bindungen am Eiweiß

Bei den von freien Lipiden gründlich gereinigten, nukleinsäurefreien Proteinen aus Kern- und Cytoplasmafraktionen von Leber- und Nierengewebe sollte die Festigkeit der Bindungen der Testosteron-4- ^{14}C -Metabolite untersucht werden.

Die zu prüfenden Eiweiße stammten aus verschiedenen Versuchen. Nach Bestimmung ihres Radioaktivitätsgehaltes durch die SIMON'sche Trockenverbrennung in Gasphase (vgl. S. 46) wurden je 10 mg im Achatmörser feinst pulverisiert und mit 10 ml einer Mischung aus Chloroform und Methanol 1:1 75 Stunden maschinell geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren und Dekantieren erfolgte noch dreimaliges Nachwaschen der Proteine mit je 2 ml des Lösungsmittels. Die erneute Radioaktivitätsbestimmung ergab, daß praktisch kaum ein Aktivitätsverlust eingetreten war. Die auftretenden Differenzen lagen im Bereich der Fehlergrenze. Zur Kontrolle wurden außerdem die Extraktionslösungen auf ihren Aktivitätsgehalt untersucht. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die ^{14}C -Steroid-Aktivität der Eiweiße aus einem 10-Minuten- und einem 180-Minuten-Versuch vor und nach der Extraktion:

		10min-Versuch			180min-Versuch		
		vor Extr dpm/mg	nach Extr. dpm/mg	dpm/ml Extr.-Lsg =dpm/mg	vor Extr.	nach Extr.	dpm/ml Extr.-Lsg. =dpm/mg
Leber	Kerne	39	32	(5)	40	37	(5)
	Cytopl.	43	40	(3)	19	15	(4)
Niere	Kerne	7	6	(2)	43	42	(2)
	Cytopl.	11	9	(0)	68	67	(3)

Tab. 1 : Gehalt an fest gebundenen ^{14}C -Steroid-Aktivitäten pro Milligramm Eiweiß aus den Fraktionen eines 10min- und eines 180min-Versuches vor u. nach 75-stündiger Digestion mit Chloroform/Methanol 1:1 (1 ml/mg); Radioaktivitätsgehalt der Extraktionslösungen (dpm/ml = die aus 1 mg Eiweiß extrahierte (?) Aktivität.

bb) Enzymatische Hydrolysen und papierchromatographische Auftrennung

Da der weitaus größte Teil der ^{14}C -Aktivität trotz intensiver Behandlung mit relativ hochpolaren organischen Lösungsmitteln fest gebunden blieb, war eine nähere Untersuchung der Lokalisation und Art dieser Steroid-Bindungen am Protein von höchstem Interesse.

Bei der Auftrennung der Eiweiße wurde auf saure und alkalische Hydrolysen verzichtet, um möglichst viele Steroid-Bindungen zu erhalten. Enzymatische Hydrolysen mit "Pronase" (39) und Leucinaminopeptidase (IAP; 15) wurden daher vorgezogen. Proteinmengen von 10, 20, 50 oder 100 Milligramm wurden nach feinst möglicher Pulverisierung zur Aufarbeitung eingewogen. Die enzymatische Hydrolyse erfolgte zunächst mit Pronase im Verhältnis 100:1 in 2 bis 10 ml Digestionslösung (0.05m Na-Phosphat-Puffer pH 7.4, 0.005m Titriplex III) bei einer konstanten Temperatur von 40° für 24 Stunden. Versuche mit höherer Pronase-Konzentration ergaben keine wesentlich besseren Hydrolyseergebnisse, während eine Verlängerung der Hydrolysezeiten von 24 auf 48 bzw. 72 Stunden die Proteolyse fast vollkommen verlaufen ließ (bis 90 proz. Abbau).

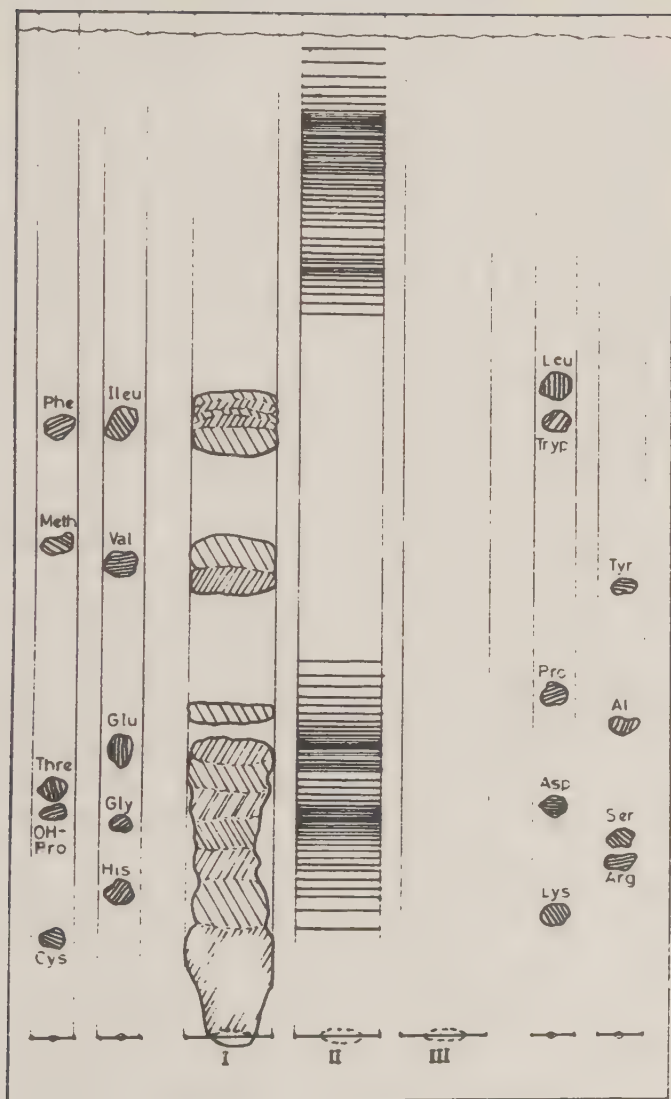
Ungelöstes wurde abzentrifugiert, der klare Überstand dekantiert und bei 40° in Spitzkolben zur Trockne eingedampft (Rotationsverdampfer). Die Lösung des Rück-

standes erfolgte meist in 0,3 ml 0,1n-HCl, so daß für die anschließende Papierchromatographie je 0,1 ml Hydrolysatlösung für jede der drei Hauptbahnen zur Verfügung standen. Anfangs wurden Standards der Aminosäuren in einer Konzentration von $10\mu\text{g}$ in $10\mu\text{l}$ mitchromatographiert (vgl. Abb. 2). Als Chromatographiepapier wurde benutzt: Schleicher und Schüll Nr. 2043b MGL, 48,5 x 49,5 cm. Es wurde absteigend im PARTRIDGE-System: n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 entwickelt (vgl. auch BRAUNITZER; 43). Dieses System zeichnete sich einerseits durch befriedigende Trennergebnisse, andererseits besonders dadurch aus, daß sämtliche bei der Proteolyse zum Teil freigesetzten ^{14}C -Steroide außerhalb des Aminosäure- und Peptid-Bereiches in Frontnähe lagen und somit keine an ninhydrin-positive Strukturen gebundene Radioaktivität vortäuschen konnten. Vorbereitende Versuche mit diesem System waren sowohl mit den Lipidextrakten als auch mit solchen ^{14}C -Steroiden gemacht worden, die nach salzsaurer bzw. enzymatischer Hydrolyse der Proteine abgespalten und mit Äther extrahiert worden waren (s.S. 38 ff).

Von den Hauptbahnen der entwickelten Chromatogramme - die Substanzverteilung war unter UV-Licht gut erkennbar - diente die mittlere zur Bestimmung der Radioaktivität im Flüssig-Szintillations-Spektrometer.

Abb. 2 : Papierchromatogramm eines "Pronase"-Hydrolysates (Beispiel: Leberkern-Proteine) auf 3 Hauptbahnen verteilt; auf Nebenbahnen: Aminosäure-Standards ($10\mu\text{g}/10\mu\text{l}$); System: n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5, absteigend, 20 Stdn.;

Hauptbahn I + Nebenbahnen : Ninhydrin-Reaktion,
 Hauptbahn II : Radioaktivitätsmessung im PSS
 Aktivitätsverteilung,
 Hauptbahn III : zur Weiterverarbeitung;



Auf der linken (I) Hauptbahn wurde - zumindest bei den ersten Versuchen - zusammen mit den Testchromatogrammen der Aminosäure-Standards die Lage der Aminosäuren und Peptide durch Ninhydrin-Reagens (0,1 % in Aceton) bestimmt.

Die so ermittelten radioaktiven, ninhydrin-positiven "Peaks" konnten nunmehr aus der dritten Bahn (III) ausgeschnitten und durch dreimaliges Behandeln mit je 10 ml H_2O bei 60° quantitativ eluiert werden.

Zur Erzielung einer noch besseren Trennung wurden diese Substanzen einer zweiten enzymatischen Hydrolyse mit Leucinaminopeptidase (LAP;15) unterworfen. Dieses Ferment, aus Rinderaugenlinsen isoliert (Serva, Entwicklungslabor Heidelberg), mußte zuvor, nach Lösung in 2 ml 0,005m Tris-Puffer pH 8.5 (enth. 0.005m $MgCl_2$) durch 30-minütiges Erwärmen bei 40° aktiviert werden. Auch für die LAP-Hydrolyse wurde durch Schätzung ein ungefähres Verhältnis von Substanz zu Ferment von 100:1 gewahrt. Nach 24-stündiger Hydrolyse in 2 bis 5 ml Tris-Pufferlösung bei 40° konnten die Spaltprodukte in oben beschriebener Weise im selben System rechromatographiert werden. Wegen der gering gewordenen Substanzmengen wurden nur zwei Hauptbahnen beschickt. Nach Entwicklung des Chromatogramms wurde ein 2 mm breiter Mittelstreifen der einen Hauptbahn und ihre Randpartien sowie die Bahnen der ebenfalls mitchromatographierten Aminosäure-Standards mit Ninhydrin-Reagens behandelt, während die beiderseits des Mittelstreifens ausgesparten Chromatogrammhälften für die Radioaktivitätsmessung verwendet wurden (FSS). Die zweite Hauptbahn, auf der die ninhydrinpositiven, radioaktiven Zonen nun zu lokalisieren waren, stand zur Weiterverarbeitung zur Verfügung.

cc) Salzsaure Hydrolyse der ^{14}C -Steroid-bindenden Peptide und Bestimmung ihrer Aminosäurezusammensetzung

Die radioaktiven, ninhydrin-positiven Zonen der zweiten Hauptbahn des nach LAP-Proteolyse erhaltenen Radio-Papierchromatogramms wurden eluiert und zur Bestimmung der Aminosäure-Zusammensetzung der hier vorliegenden Verbindungen salzsauer hydrolysiert. Die Hydrolyse erfolgte mit 6n-HCl in Bombenrohren aus Pyrex-Glas bei 110° während 24 Stunden (Bombenofen: Fa. Gerhards, Bonn). Das Hydrolysat, im Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft, wurde in 5 ml 0,1n-HCl gelöst. In Anteilen dieser Lösung konnte mit Hilfe des TECHNICON-AUTO-ANALYZERS die qualitative und quantitative Aminosäure-Zusammensetzung der ^{14}C -Steroid-bindenden Peptide ermittelt werden.

dd) Säulenchromatographische Auftrennung von Hydrolysaten

Neben der papierchromatographischen Auftrennung der durch enzymatische Hydrolyse erhaltenen Restpeptide und Aminosäuren sind auch säulenchromatographische Trennungen ausgeführt worden. Es wurde zunächst mit SEPHADEX G 25, später mit DOWEX 1 X 2 (200-400 mesh) gearbeitet.

⌘) Trennung mit der SEPHADEX G 25 - Säule

Die nach "Pronase"-Hydrolyse der Kern- und Cytoplasma-Proteine (20 - 100 mg) von Leber- und Nierenzellen erhaltenen Spaltprodukte wurden in 5 ml 0,1m Pyridinlösung gelöst. Auf eine 70 x 1,5 cm - Säule, die mit Sephadex G 25 ca. 60 cm hoch gestopft war, wurden 2ml Hydrolysatlösung aufgesetzt. Als Laufmittel diente 0,1m Pyridinlösung, mit der die Säule auch vorgereinigt worden war. Mittels Fraktionssammler konnten 70 Fraktionen zu je 5 ml aufgefangen werden.

Mit 0,5 ml jeder Fraktion wurde die Ninhydrin-Reaktion ausgeführt.

Ninhydrin-Reagens: 6,66 g Ninhydrin, 3,0 Hydrindantin, 750 ml Methylcellosolve, 250 ml 4m-Na-Az-Puffer pH 5,5. Nach 15-minütigem Erhitzen im kochenden Wasserbad mit je 1 ml dieser Reagenslösung und nachfolgendem Zusatz von je 8 ml einer 1:1 - Mischung aus Alkohol 96 % und Wasser konnten die Extinktionen bei 750 nm im Spektralphotometer (Zeiss) gemessen werden. Jene Fraktionen, die im 0,5 ml - Aliquot ninhydrin-positive Substanzen enthielten, wurden zur Trockne abgedampft und ihr Radioaktivitätsgehalt im FSS bestimmt.

Die Abbildung 3 zeigt ein Beispiel:

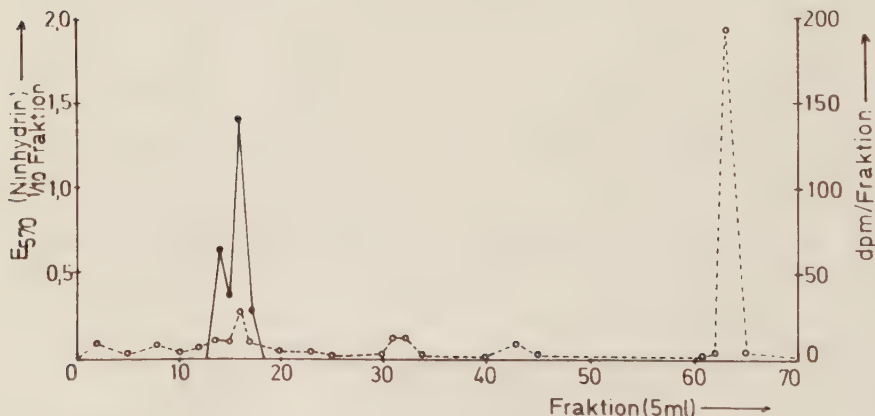


Abb. 3 : Radio-Säulenchromatogramm eines "Pronase"-Hydrolysates (Beispiel Lebercytoplasma-Protein, 3 Std. nach i.p.-Injektion von 300 μ c Testosteron-4- 14 C in eine 30 Tage alte männliche Sprague-Dawley-Ratte); Sephadex G 25 -Säule (70 x 1,5 cm); 0,1m Pyridin; 5 ml - Fraktionen;
 --o-- Extinktionen nach Ninhydrin-Reaktion
 —o— Radioaktivität (FSS)

β) Trennung mit der DOWEX 1 X 2 - Säule

Das Harz wurde mit NH_4OH und Eisessig in der üblichen Weise vorbehandelt, neutralisiert und in eine 92 x 1,5 cm - Säule eingeschlämmt. Die Äquilibrierung erfolgte zuerst mit einer 4 proz. Pyridinlösung, die mit Eisessig auf pH 7,7 eingestellt worden war, danach mit 1%igem Pyridinazetat-Puffer pH 7,1.

Das durch "Pronase"-Hydrolyse der Eiweiße erhaltene Aminosäure- und Peptidgemisch wurde in 5 ml 4 proz. Pyridinazetat-Puffer pH 8,3 gelöst und auf die Säule aufgesetzt. Die Elution begann mit 1 proz. Pyridinazetat-Puffer pH 7,1. Mit Hilfe des Fraktionssammlers wurden 5 ml - Fraktionen abgemessen. Ab Fraktion 55 wurde ein Gradient folgender Zusammensetzung angeschlossen: Zu 100 ml einer Lösung von Pyridin und Kollidin (je 1 %) in Wasser, mit Essigsäure auf pH 7,0 eingestellt, tropften insgesamt 200 ml 0,1 n Essigsäure. Ab Fraktion 155 (bis 200) wurde die Elution mit Eisessig fortgesetzt.

Ein Zehntel jeder Fraktion diente der Bestimmung ninhydrin-positiver Substanzen (s.o.). Von den verbleibenden Lösungsmengen wurde die Hälfte in "Vials" abpipettiert, das Lösungsmittel im Abdampfgerät entfernt und die Rückstände zur Bestimmung ihres Radioaktivitätsgehaltes im FSS mit je 10 ml Szintillationslösung (s.S. 49) versetzt.

Die ermittelten Extinktionen und Aktivitäten wurden graphisch dargestellt (vgl. Abb. 21, S. 89). Bei jenen Fraktionen, die Radioaktivität und ninhydrinpositive Substanzen gleichzeitig enthielten, wurde die noch verbliebene Hälfte des Fraktionsvolumens folgendermaßen weiterverarbeitet:

Die Substanzen der betreffenden Fraktion z.B. Frakt. 13 d. Abb. 21 (Maximum des ersten ninhydrinpositiven, radioaktiven Peaks (A)) wurden in 0,4 ml 0,1n-HCl gelöst und 0,1 ml davon mit Hilfe des TECHNICON-AUTO-ANALYZERS auf Aminosäure-Zusammensetzung und Peptidgehalt untersucht. Weitere 0,1 ml wurden mit 5 ml 6n-HCl versetzt und im verschmolzenen Bombenrohr einer 24-stündigen Hydrolyse bei 110° unterworfen.

Die Aminosäure-Zusammensetzung des Hydrolysates ließ sich dann ebenfalls mit dem Analyzer ermitteln (s.S. 90). Die restlichen 0,2 ml konnten für Kontrollanalysen eingesetzt werden.

i) Isolierung der proteingebundenen ^{14}C -Steroide
(Versuch ihrer Identifizierung)

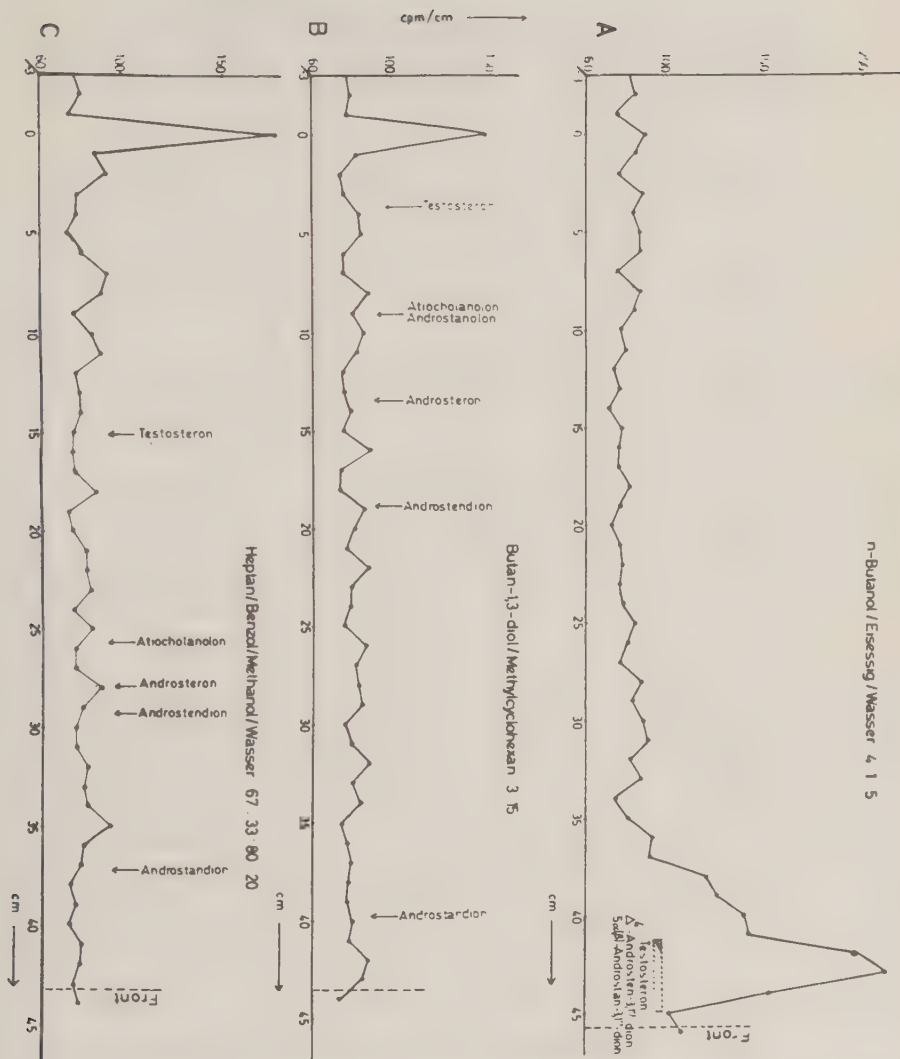
Zur Untersuchung der ^{14}C -Aktivitäten, die in fester Bindung mit Proteinbausteinen vorliegen, wurden je 10 mg der aus Leber und Niere isolierten Kern- und Cytoplasma-Proteine verschiedener Versuche der salzsauren Hydrolyse unterworfen. Nach 24-stündigem Erhitzen mit 6n-HCl in zugeschmolzenen Bombenröhrchen (Pyrex-Glas) wurde das Hydrolysat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und die Rückstände mit je 5 ml H_2O aufgenommen. Zur Extraktion der abgespaltenen ^{14}C -Steroide erfolgte dreimaliges Ausschütteln mit je 5 ml Äther. Die vereinigten Ätherauszüge wurden eingedampft und die Substanzen in 0,3 ml Methanol/Chloroform 1:1 gelöst. Mit 0,1 ml dieser Lösung wurden papierchromatographische Trennungen in verschiedenen Systemen ausgeführt.

Abb. 4 : Radio-Papierchromatogramme der nach salzsaurer Hydrolyse der radioaktiven Proteine freigesetzten ^{14}C -Metabolite des Testosterons (Ätherextr.)

A) n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5

B) Butan(1,3)diol-Methylcyclohexan 1:5

C) n-Heptan/Benzol/Methanol/Wasser 67:33:80:20



Die Bezeichnungen in den Abbildungen kennzeichnen die Lage der eingesetzten Standards.
(Erläuterungen s.S. 38 u. 40)

Als Standards wurden jeweils eingesetzt ($10\text{ }\mu\text{g}$ in $10\text{ }\mu\text{l}$): Testosteron, Androst-4-en-3,17-dion (Androstendion), 5 β -Androstan-3 α -ol-17-on (Ätiocholanolon), 5 α -Androstan-3,17-dion (Androstandion), 5 α -Androstan-3 α -ol-17-on (Androsteron).

System A : n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 (PARTRIDGE); absteigend, 20 Stunden, Schleicher u. Schüll Nr. 2043 b MGL; (Abb. 4 A)

System B : Butan(1,3)diol-Methylcyclohexan 3:15, abst., 9 Stunden, Whatman 1 imprägniert mit Methanol/Butan(1,3)diol 3:1; (Abb. 4 B)

System C : n-Heptan/Benzol/Methanol/Wasser 67:33:80:20, abst., 3.5 Stunden, Whatman 2; (Abb. 4 C)

Der Analysensubstanz wurden jeweils 10 g Testosteron sowie $10\text{ }\mu\text{g}$ Androst-4-en-3,17-dion direkt zugesetzt. Diese Maßnahme diente der späteren genauen Lagebestimmung der Substanzen, da im Vergleich zu den parallel laufenden reinen Standards bei dem Metabolitgemisch mit einer geringen Rf-Verschiebung gerechnet werden mußte.

Nach Entwicklung der Chromatogramme konnten die Substanzen 5 β -Androstan-3 α -ol-17-on, 5 α -Androstan-3,17-dion, und 5 α -Androstan-3 α -ol-17-on durch die Zimmermannsche Farb-reaktion¹ (45) dargestellt werden, während die Lage von Testosteron und Androst-4-en-3,17-dion auf den Testchromatogrammen sowie im Mischchromatogramm der ¹⁴C-Steroide außer durch die Isonicotinsäure-Reaktion² (50) in einigen Fällen auch durch Kontakt-Photographie sichtbar gemacht werden konnte. Die Belichtung erfolgte mit einer UV-Lampe ($\lambda = 360\text{ nm}$) auf Copyline Contact - Papier während 1 Sek.

1 Nach Vorbehandlung der Testchromatogr. mit 15 proz. alk. KOH : Befeuchten mit frischbereiteter Lösung von 500 mg p-Dinitrobenzol in 25 ml abs. Alkohol;

2 Isonicotinsäure-Reagens: 200 mg Isonicotinsäure + 25 ml Methanol + 1 Tr. conc. HCl;

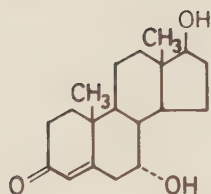
Um die Mischchromatogramme für eine eventuelle Weiterverarbeitung zu erhalten, wurde zunächst versucht, die Verteilung der Radioaktivität durch Autoradiographie zu bestimmen. Nach 14-tägigem Kontakt konnte auf dem Röntgenfilm noch keine Schwärzung beobachtet werden. Eine Verstärkerfolie wurde nicht verwendet. Da auch mit dem Radio-papierchromatographen (Fieseke u. Hoepfner) die geringe Aktivität nicht sicher erfaßt werden konnte, mußten die Chromatogramme im Flüssig-Szintillations-Spektrometer ausgemessen werden.

Die im Partridge-System chromatographierten ^{14}C -Metabolite lagen ausnahmslos unmittelbar unterhalb der Front des Laufmittels (vgl. Abb. 4 A).

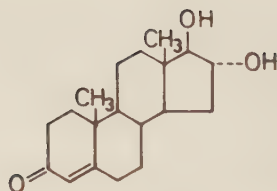
In den beiden anderen Systemen wurden die Metabolit-Standards gut getrennt. Die Radioaktivität jedoch blieb am Start liegen d.h., es mußte sich bei den am Eiweiß gebundenen ^{14}C -Steroiden um hochpolare Testosteron-Metabolite handeln (vgl. Abb. 4 B u. C).

Die nach der enzymatischen Hydrolyse der Eiweiße mit "Pronase" teilweise freigesetzten ^{14}C -Steroide lagen nach Papierchromatographie der Hydrolysate im Partridge-System ebenfalls isoliert in Nähe der Front. Sie wurden eluiert und im System B : Butan(1,3)diol-Methylcyclohexan 1:5 rechromatographiert. Die enzymatisch abgespaltenen ^{14}C -Steroide erwiesen sich wiederum als hochpolare Substanzen, die im Bereich hydroxylierter Testosteron-Metabolite am Start zurückblieben.

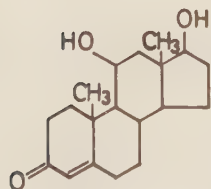
Um sie zu identifizieren, wurde ein Versuch mit dem papierchromatographischen System (7): Cyclohexan/Toluol/Methanol/Wasser 5:5:7:3 unternommen, wobei die in umseitiger Formelsammlung aufgeführten hydroxylierten Testosteron-Metabolite als Standards eingesetzt wurden.



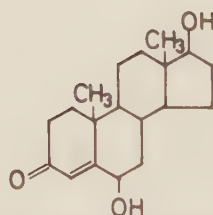
7 α -Hydroxy-Testosteron



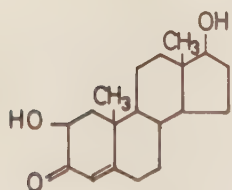
16 α -Hydroxy-Testosteron



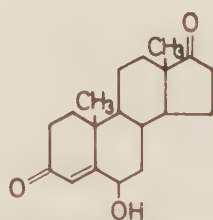
11 β -Hydroxy-Testosteron



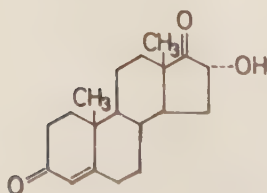
6 β -Hydroxy-Testosteron



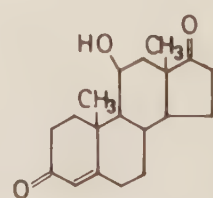
2 β -Hydroxy-Testosteron



6 β -Hydroxy-Androst-4-en-3,17-dion



16 α -Hydroxy-Androst-4-en-3,17-dion



11 β -Hydroxy-Androst-4-en-3,17-dion

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis:

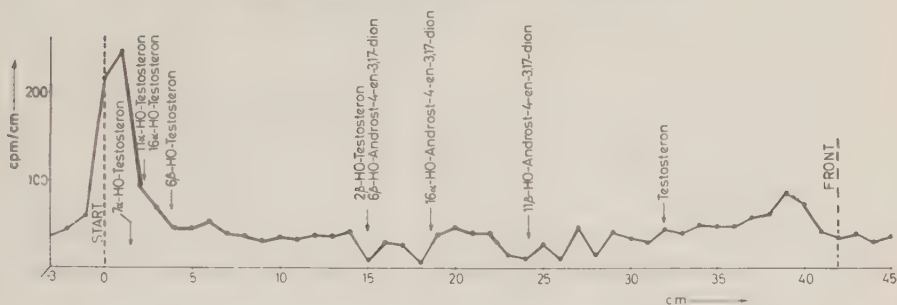


Abb. 5 : Radio-Papierchromatogramm der durch salzsaure bzw. enzymatische Hydrolyse aus den radioaktiven Proteinen freigesetzten und ausgeätherten ^{14}C -Metabolite des Testosterons; 100 mg Leber-Kern-Protein eines 180 Min.-Versuches mit 0,1mc Testosteron-4- ^{14}C ; Cyclohexan/Toluol/Methanol/Wasser 5:5:7:3, absteigend, 2 Stdn.;

Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß Testosteron-Metabolite mit mehr als 3 Sauerstofffunktionen oder zumindest Trihydroxy-Metabolite an den hier untersuchten Peptiden gebunden sind. Die Radioaktivitätszone im Frontbereich erlaubt den Schluß, daß bei den Bindungen auch niederpolare Metabolite des Testosterons beteiligt sind, die entweder als Konjugate vorliegen oder (und) besonders fest mit Aminosäuren gekoppelt sind.

3 Mengen- und Radioaktivitätsbestimmungen

a) DNS- und RNS-Mengenbestimmung durch Spektralphotometrie

Die nach SCHMIDT und THANNHAUSER (46) getrennten Nukleinsäuren (Kern- und Cytoplasma-RNS sowie DNS von Leber- und Nierenkernen) gelangten in je 2 ml gelöst (s.S. 21) zur Weiterverarbeitung. Zunächst erfolgte die spektralphotometrische Mengenbestimmung.

aa) Bestimmung der RNS mit der Orcin-Methode (28)

Zur Aufstellung einer Verdünnungsreihe wurde zunächst 1 ml der Stammlösung (2 ml) mit 0,2n-HCl auf 10 ml verdünnt. Hiervon wurden 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1 ml entnommen und jede Probe mit 0,2n-HCl auf ein Volumen von 1,0 ml gebracht. Es sollten auf diese Weise Konzentrationen ermittelt werden, deren Extinktionen im linearen Bereich der Eichkurve lagen.

Zu je 1 ml der so verdünnten RNS-Lösungen wurde 1 ml des frisch bereiteten Orcin-Reagens pipettiert. (10 mg Orcin in 1 ml einer Lösung von 33 mg FeCl_3 in 100 ml conc. HCl). Unter Rückflußkühlung wurde 45 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt, wobei Grünfärbung des Reaktionsgemisches eintrat. Nach Abkühlung und Zusatz von 2 ml H_2O wurden die Extinktionen bei 660 nm mit dem Spektralphotometer gemessen (anfangs mit Beckman Modell DU, später mit dem Spektralphotometer PMQ II von Zeiss).

An Hand der Eichkurve (vgl. Abb. 6), die zuvor unter denselben Bedingungen mit einer Standard-RNS (Fluka) aufgestellt worden war, konnten die RNS-Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

bb) Bestimmung der DNS mit der Diphenylamin-Methode (12)

Je 1 ml der DNS-Stammlösung (2 ml 0,01n-NaOH, s.S.21) aus Leber- und Nieren-Kernfraktion wurden mit 0,01-n NaOH auf 10 ml verdünnt. Hiervon wurde ebenfalls, wie bei der RNS-Bestimmung beschrieben, eine Verdünnungsreihe hergestellt.

1 ml Untersuchungslösung wurde mit 2 ml des frisch bereiteten Diphenyl-Reagens versetzt.

(300 mg Diphenylamin + 20 ml Eisessig + 0,3 ml conc. H_2SO_4 + 0,1 ml Acetaldehyd (16 mg/ml)).

Bei 17-stündigem Erwärmen auf 30° trat Blaufärbung ein. Die optische Dichte wurde bei 595 nm gemessen. Die den Extinktionswerten entsprechenden DNS-Mengen ließen sich wiederum einer Eichkurve entnehmen, die in analoger Weise wie bei der RNS-Bestimmung aufgestellt wurde (vgl. Abb. 6).

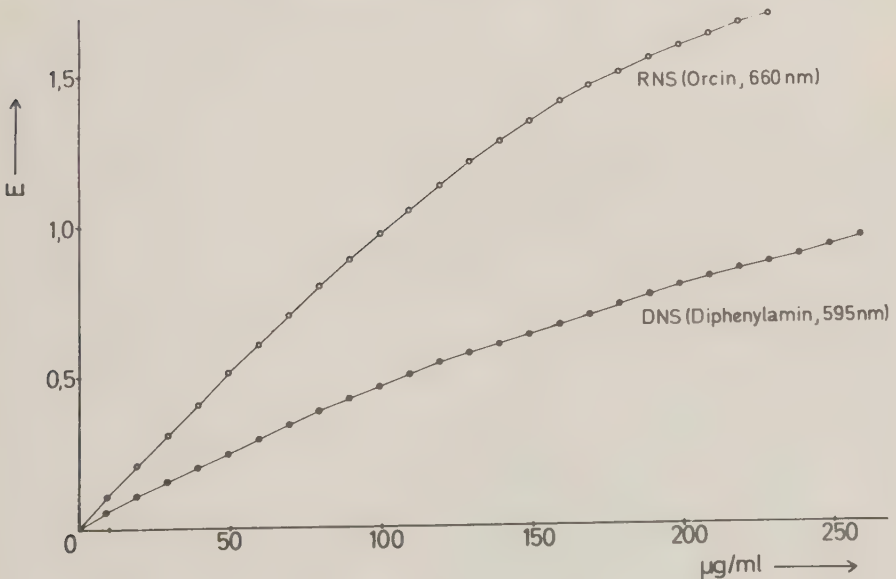


Abb. 6 : RNS- und DNS-Eichkurven

b) Radioaktivitätsbestimmungenaa) SIMON'sche Trockenverbrennung u. Messung in Gasphase

Bei diesem zur Zeit exaktesten Verfahren (49) zur Bestimmung der ^{14}C -Aktivität handelt es sich im Prinzip um eine gasanalytische Abtrennung des durch Trockenverbrennung entstandenen $^{14}\text{CO}_2$. Anschließend erfolgt die Radioaktivitätsbestimmung im Gasfüllzählrohr (s. Bild 3).

Die Analyse besteht aus drei Arbeitsphasen:

1. Die Substanz wird in evakuierten (10^{-2} Torr) Spezialbombenröhrchen bei 650° (2 Stunden im Muffelofen) verbrannt. Hierbei dienen als Oxydationsmittel für etwa 5 mg Substanz 50 mg CuO und 80 mg KClO_4 .
2. In einer Vakuumlinie (Bild 1 u. 2) werden aus dem entstandenen Gasgemisch CO_2 (enth. $^{14}\text{CO}_2$) und H_2O durch Kühlfallen unterschiedlicher Temperatur voneinander getrennt (Trockeneis/Alkohol für H_2O und flüssiger Stickstoff für CO_2). Das CO_2 wird, gegebenenfalls nach manometrischer Messung, in ein Gasfüllzählrohr destilliert und mit Methan auf 1 Atmosphäre gebracht.
3. Die Radioaktivitätsmessung erfolgt anschließend in Proportional-Zählung (Bild 3).

Die Bestimmung der ^{14}C -Aktivität nach SIMON fand immer dann Anwendung, wenn Substanzmengen von mindestens 2 bis 5 Milligr. zur Verfügung standen. Es wurden allerdings auch einige Verbrennungen mit geringerer Substanzmenge durchgeführt, bei denen dann aber als Trägerstoff einige Milligramm Saccharose zugegeben werden mußten. Die Radioaktivität der 14 -Steroide, die an Proteinen bzw. Mucopolysaccharid-haltigen Pro-

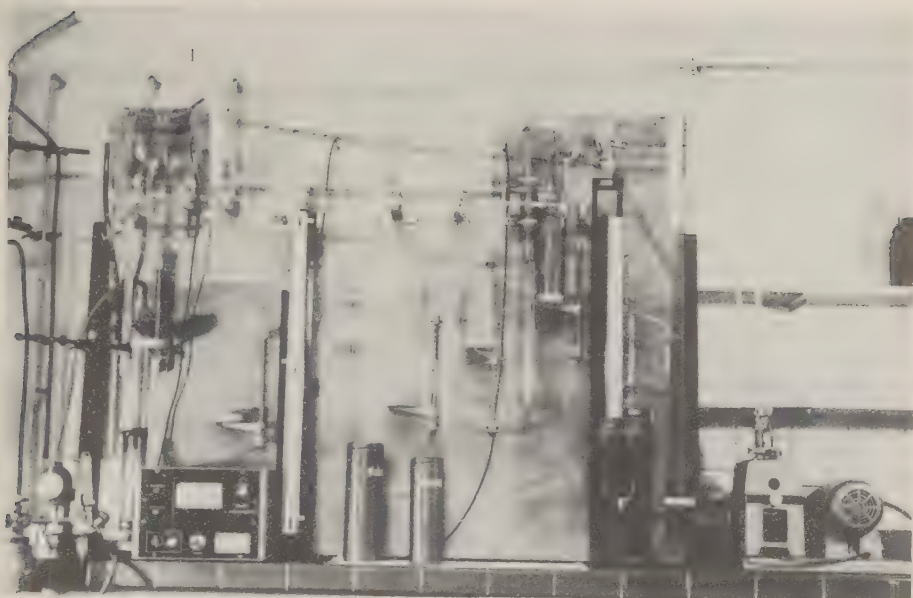


Bild 1 : SIMON'sche Apparatur zur Isolierung und manometrischen Bestimmung von $^{14}\text{CO}_2$



Bild 2 :
Initiale Arbeitsphase:
Zertrümmerung des Bombenrohres

teiden gebunden waren, wurde stets nach SIMON bestimmt. Bei einigen Versuchen, bei denen sehr viel Organgewebe zur Aufarbeitung gelangt war, wurden mit dieser Methode auch die Nukleinsäuren auf ihren Gehalt an ^{14}C -Steroiden geprüft.

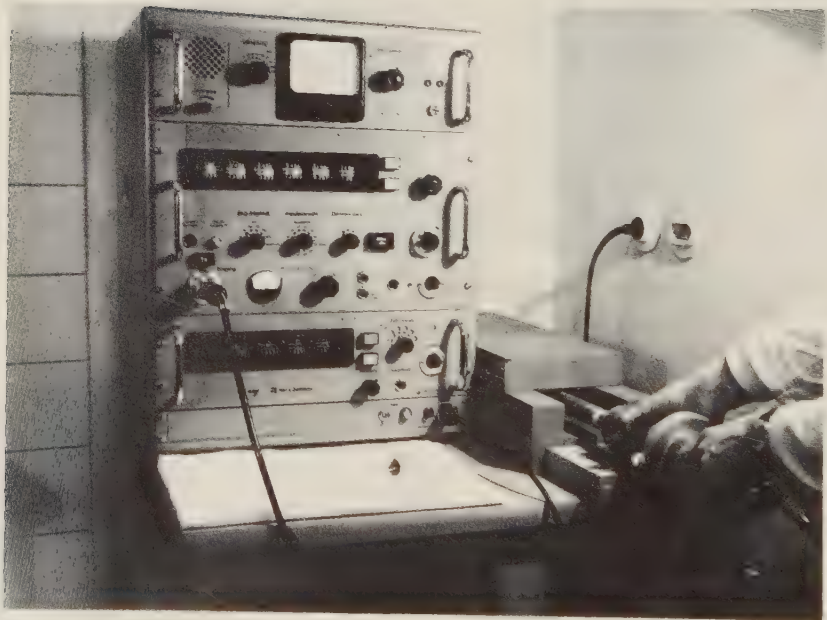


Bild 3: Messung der ^{14}C -Aktivität im Gasfüllzählrohr

bb) Liquid - Scintillation - Methode

Dieses Verfahren eignet sich besonders zur Erfassung von Radioaktivitäten, die mit unwägbaren Substanzmengen verbunden sind. So ließen sich neben den in organischen Lösungsmitteln löslichen ^{14}C -Steroid-Verbindungen auch die in wäßriger Phase vorliegenden RNS- und DNS-Fractionen auf ihren Aktivitätsgehalt untersuchen.

Für die Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung auf Papierchromatogrammen erwies sich das Flüssig-Szintillations-Verfahren meist als unentbehrlich, da selbst die Empfindlichkeit der fensterlosen Radio-Papierchromatographen in der Regel zu klein war. Die Chromatogrammbahnen wurden zu diesem Zweck in 1 cm lange Querstreifen zerschnitten. Diese Streifen wurden einzeln in nummerierte "Vials" eingebracht, die 10 ml Szintillationslösung enthielten.

(Szintillationslösung: 4 g PPO = 2,5-Diphenyloxazol + 0,052 g Dimethyl-POPOP = 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazol)-Benzol in 1 Liter Toluol).

Auch die in Chloroform gelösten Lipide (s.S. 20) wurden unter Verwendung der gleichen Szintillationslösung unmittelbar im FSS ausgemessen.

Für die Radioaktivitätsbestimmung der in wäßrigen Systemen vorliegenden Substanzen z.B. RNS und DNS diente eine besondere, hydrophile Szintillatorlösung: 4 g PPO + 0,015 g Dimethyl-POPOP in 1 l Toluol; davon 600 ml + 400 ml abs. Alkohol.

Ein in manchen Fällen einer Parallelprobe zugesetzter interner Standard von 100 Zpm/ml bzw. 1000 Zpm/ml (hergestellt mit ^{14}C -Benzoessäure: 3,125 mg bzw. 31,25 mg pro 100 ml Toluol) ermöglichte die Bestimmung der Ausbeute in Prozenten und damit die Umrechnung der vorgefundenen Impulse pro Minute (Ipm) auf die tatsächlich vorliegenden Zerfälle pro Minute (Zpm).

Die Proben wurden je nach der zu erwartenden Impulsrate 10 oder 30 Minuten im Tri-Carb Liquid-Scintillation-Spektrometer (Packard, Model 314 E bzw. 3003) ausgemessen.

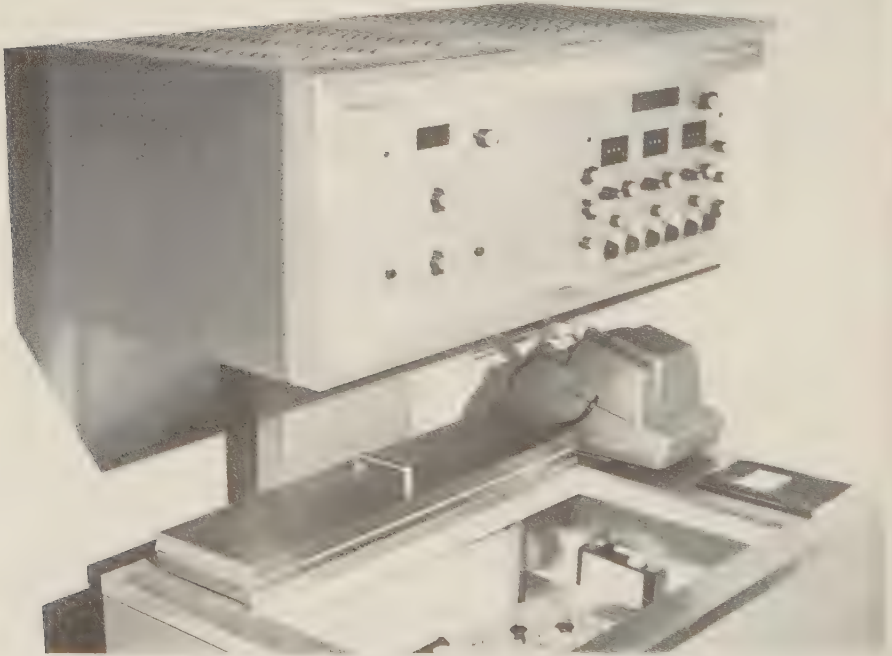


Bild 4 : Flüssig-Szintillations-Spektrometer
(Tri-Carb Packard, Model 3003)

cc) Radio - Papierchromatographie

Die Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung auf den Papierchromatogrammen mit Hilfe des Radio- Papierchromatographen wurde bei Durchlaufgeschwindigkeiten von 6 bzw. 12 mm/h ausgeführt. Für die Untersuchung der nach "Pronase"-Hydrolyse papierchromatographisch aufgetrennten Aminosäure- und Peptid-Gemische erwies sich dieses Gerät als zu unempfindlich. Nur bei der Auftrennung der Lipoidextrakte, die den größten Gehalt an ^{14}C -Steroiden enthielten, konnte diese Meßtechnik Anwendung finden. Doch diente sie auch hier nur zur groben Orientierung (vgl. S. 29).

Eine 5- bis 6-fach bessere Ausbeute ermöglichte der für radiopapierchromatographische Zwecke umgebaute Dünnschicht-Scanner (Bild 5) von Prof. Dr. Berthold. Hiermit gelang bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 120 mm/h (Hochspannung 3000 V, Dämpfung 30 mV, Meßbereich 10^2) eine ausreichende Erfassung der radioaktiven Zonen auf Lipoidextrakt-Chromatogrammen. Es muß an dieser Stelle aber noch einmal betont werden, daß bei der weitaus überwiegenden Zahl der Papierchromatogramme der Einsatz des FSS unumgänglich war.

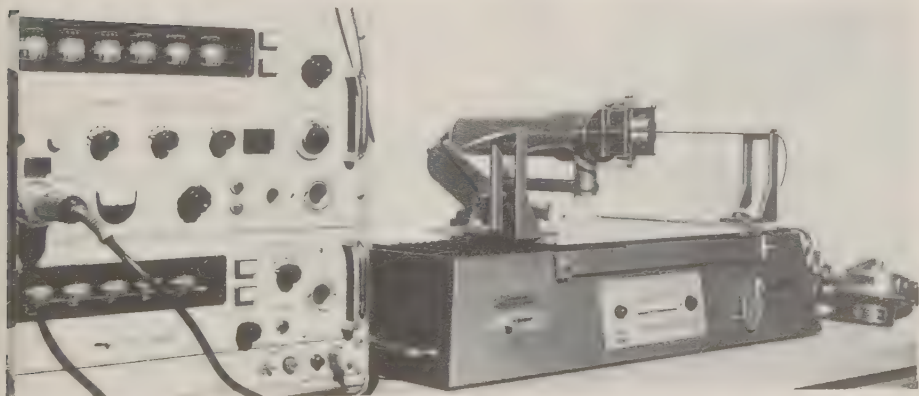


Bild 5 : Dünnschicht-Scanner von Berthold; umgebaut für die Ausmessung von Radio-Papierchromatogrammen

dd) Radio - Dünnschichtchromatographie

Wie bei der Aufarbeitung der Lipide beschrieben (vgl. S. 23 ff), wurden auf der Trägerplatte, entsprechend der Lage der interessierenden Lipoidgruppen, 4 Bereiche abgegrenzt. Die Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung erfolgte mit dem Dünnschicht-Scanner von Prof. Dr. Berthold (Wildbad).

Bei einem Methandurchfluß von 3 Perlen pro Sekunde, einer Laufgeschwindigkeit von 120 mm/h, einer Hochspannung von 3000 V, einer Eingangsempfindlichkeit von 25 mV, einem Meßbereich von 3×10^3 und einer Dämpfung von 30 mV wurden optimale Ergebnisse erzielt.

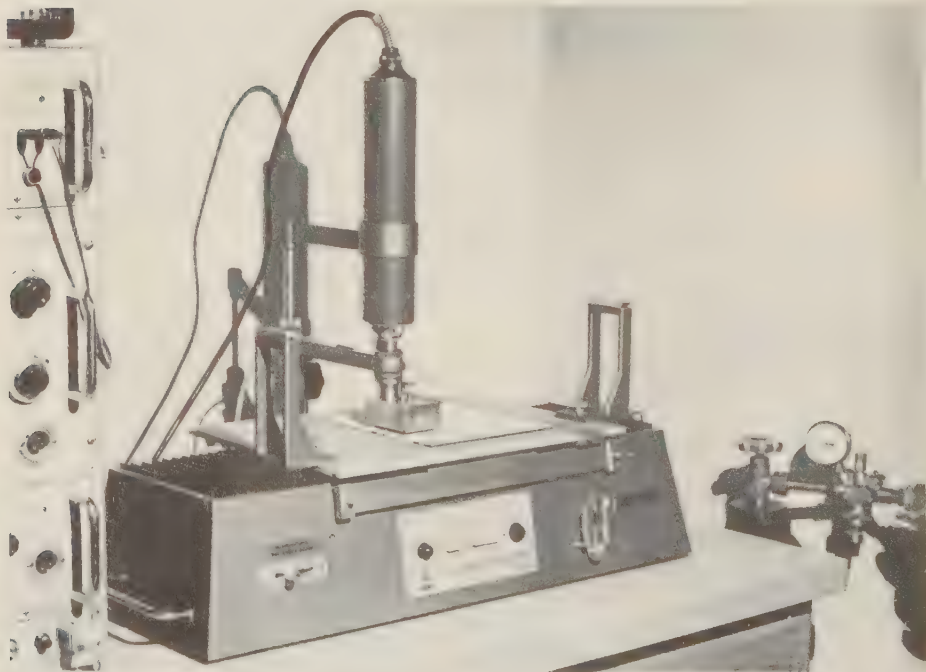


Bild 6 : Radio-Dünnschichtchromatograph von Berthold

EXPERIMENTELLER TEIL

II ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1 Übersicht über die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Stoffgruppen

In der physikal.-chem. Abteilung des Physiolog.-Chem. Institutes Bonn wurde in den letzten Jahren über die Verteilung von Testosteron-4- ^{14}C - Aktivität auf Organe, Organteile und Zellorganellen gearbeitet. In Analogie zu diesen Studien sollte in dieser Arbeit zunächst versucht werden, eine Übersicht über die Radioaktivitätsverteilung auf die wichtigsten Stoffklassen der beiden Organe, Leber und Niere, zu erhalten. Hierbei war ein Vergleich der Verteilung des Testosteron-4- ^{14}C bzw. seiner Metabolite zwischen Versuchen mit 10- und 180-minütiger Einwirkungszeit nach intraperitonealer Injektion von besonderem Interesse. Es konnte somit die initiale Verteilung verglichen werden mit einer solchen, bei der freies Testosteron schon weitgehend durch Metabolisierung und Ausscheidung verschwunden ist. Nach 3 Stunden ist, wie frühere Versuche von DIRSCHERL und MOSEBACH (10) zeigten, die Konzentration der radioaktiven Metabolite durch Ausscheidung in Galle und Harn schon erheblich abgesunken.

Die folgende Tabelle gibt ein Beispiel für die Verteilung der ^{14}C -Steroid-Aktivität auf die einzelnen Stoffgruppen:

		Lipide dpm/g Gewebe		Rohproteine dpm/mg		rohe Mucopol. Sacch. dpm/mg
		10 min	180 min	10 min	180 min	10 min
Leber	Kerne 1.	51 300	30 300	39	40	12
	Kerne 2.	16 400		27		15
	Cytopl. 1.	207 300	29 600	43	20	37
	Cytopl. 2.	87 900		20		7
Niere	Kerne 1.	32 400	14 300	7	43	0
	Kerne 2.	14 400		6		4
	Cytopl. 1.	78 100	66 700	11	69	7
	Cytopl. 2.	109 600		8		11

Anm.: Die für DNS und RNS ermittelten Aktivitäten lagen innerhalb der Fehlergrenzen der Meßtechnik

Tab. 2 : Radioaktivitäten einiger Stoffgruppen aus Kern- und Cytoplasmafraktionen von Leber und Niere 10 Min. (2 Versuche) und 180 Min. nach i.p.-Injektion von $50 \mu\text{c}$ ($500 \mu\text{g}$) Testosteron-4- ^{14}C in 30 Tage alte, männliche Sprague-Dawley-Ratten.

Auf die Radioaktivitätsverteilung innerhalb der Lipidfraktionen wird im nächsten Abschnitt eingegangen (S.57). In die Tabelle 2 wurden die Ergebnisse für RNS und DNS nicht aufgenommen, da die Impulsraten im Bereich der Fehlergrenze der Flüssig-Szintillations-Spektrometrie lagen. Die in wenigen Fällen gemessenen höheren Aktivitäten waren auf Verunreinigungen durch proteingebundene ^{14}C -Steroide zurückzuführen.

Vergleicht man die in Tabelle 2 aufgeführten Aktivitäten miteinander, so lassen sich folgende Ergebnisse ablesen:

Mittelt man für die Lipide die Impulsraten der beiden 10-Minuten-Versuche und berechnet für jedes Organ den prozentualen Radioaktivitätsanteil in den Fraktionen, so erhält man sowohl bei Leber als auch bei Niere Verhält-

nisse von 20 % (Kerne) zu 80 % (Cytoplasma); vgl. Tab. 3 A. Das gleiche gilt beim 180-Minuten-Versuch für die Niere, während sich bei der Leber ein Verhältnis von 50 % zu 50 % eingestellt hat (Tab. 3 B).

Vor Beurteilung dieses Ergebnisses ist es von Interesse, einen Vergleich mit einem weiteren 180-Min.-Versuch anzustellen, bei dem unter sonst gleichen Bedingungen 300 μ c Testosteron-4- 14 C injiziert wurden (Tab. 3 C).

	A	10 min (2 Versuche 50 μ c gemittelt)		B	180 min Versuch 50 μ c		C	180 min Versuch 300 μ c	
		Zpm/g Gewebe	%		Zpm/g Gewebe	%		Zpm/g Gewebe	%
Leber	Kerne	33 850	18,7		30 300	50,6		11 050 $\cdot 10^2$	73,5
	Cytopl.	147 600	81,3		29 600	49,4		4 000 $\cdot 10^2$	26,5
Niere	Kerne	23 400	20,0		14 300	17,7		800 $\cdot 10^2$	60,0
	Cytopl.	93 850	80,0		66 700	82,3		540 $\cdot 10^2$	40,0

Tab. 3 : Prozentuale Verteilung der extrahierbaren Lipidaktivitäten (aus Leber- und Nierenzellen) auf die Kern- und Cytoplasmafraktionen; Vergleich zwischen Versuchen mit 50 μ c und (A) 10-Minuten- und (B) 180-Minuten-Dauer sowie einem 180-Minuten-Versuch mit 300 μ c (C).

Bei einem Vergleich der Werte der beiden 180-Minuten-Versuche erkennt man sowohl bei Leber als auch bei Niere, daß mit steigender Radioaktivität bzw. Menge des injizierten Hormons der prozentuale Anteil der Kerne an der Gesamt-Radioaktivität beträchtlich zunimmt. Das gilt, wie zu erwarten war, für die Leber in höherem Maße als für die Niere, da schon beim 180-Minuten-Versuch mit 50 μ c der Anteil der Radioaktivität in den Leberkernen ebenfalls schon vergrößert war.

Offensichtlich fördern sowohl zunehmende Versuchszeiten als auch steigende Hormonmenge den Bindungsanteil der Kernfraktion. Man könnte daraus den Schluß ziehen, daß bei subphysiologischen Dosen der Cytoplasmaanteil insbesondere bei sehr kurzen Versuchszeiten noch mehr im Vordergrund steht. Möglicherweise kommt darin ein gewisser Zeitbedarf des Hormons für das Durchdringen der Zelle in Richtung Kern zum Ausdruck; doch unbeschadet eines Zeitbedarfes darf nicht übersehen werden, daß Wirkungen des Testosterons, etwa die RNS-Synthese, schon nach 10. bis 20 Minuten nachweisbar sind (KENNEY, 21).

Das Verhältnis von etwa 20 % : 80 % für den Radioaktivitätsanteil der Kern- und Cytoplasma-Lipidfraktion bei kurzen Versuchszeiten stimmt mit Ergebnissen überein, die von MOSEBACH u. M. (32, 36) beschrieben wurden.

2 Verteilung der Radioaktivität innerhalb der Lipidfraktion

Dem Sinn der vorliegenden Arbeit entsprechend, dienten die hier zusammengefaßten Experimente der Klärung der Frage, ob und in welchem Umfang das radioaktive Testosteron(bzw. seine Metabolite) an andere Lipide gebunden wird. Es ist selbstverständlich, daß diese Frage nur behandelt werden kann, wenn gleichzeitig ein Überblick über die Menge und Verteilung der bekannteren Konjugate gewonnen wird. Es sei an dieser Stelle betont, daß zur Zeit für in-vivo-Versuche unter physiologischen Bedingungen so gut wie nichts über die zu bestimmten Zeiten in den Organen vorliegenden Konjugate bekannt ist. Unsere heutigen Kenntnisse über Testosteron-Konjugate entstammen fast ausschließlich in-vitro- und Infusions-Versuchen sowie den Studien von Körperflüssigkeiten (Serum, Galle, Urin).

a) Aktivitätsverteilung auf einem universellen Dünnschicht-
-Chromatogramm

Führt man mit den Lipidextrakten aus Kern- und Cytoplasma-Fraktionen von Leber und Niere dünnschicht-chromatographische Trennungen aus, wie sie im methodischen Teil (vgl. S. 25) beschrieben wurden (s. Auch Abb. 1, S. 26-27), so erhält man in allen Fällen ähnliche Aktivitätsverteilungen:

Im Bereich 1, in dem unpolarere Metabolite als $5\alpha(\beta)$ -Androstan- $3,17$ -dion zu erwarten wären, wurde regelmäßig keine Radioaktivität gefunden.

Im Bereich 2, der Metabolite mit Polaritäten zwischen 5β -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol und $5\alpha(\beta)$ -Androstan- $3,17$ -dion umfaßt, treten Metabolite auf, die aus Arbeiten von MOSEBACH u. RATH (33) über die initialen Metabolite von Testosteron in den Zellfraktionen von Leber und Niere bekannt sind.

Bereich 3 enthält die noch wenig erforschten in-vivo-Konjugate und -Metabolite des Testosterons mit mehr als zwei Sauerstofffunktionen. Hier ist vor allem bei der Leber der größte Aktivitätsanteil zu finden.

Im Bereich 4, der entsprechend der Lage der wichtigsten Phospholipide abgegrenzt wurde, ist dagegen weniger Radioaktivität zu finden.

Die Abbildung 7 zeigt zwei repräsentative Beispiele aus einem Versuch, bei dem die Aufarbeitung der Leber und der Nieren ohne vorherige Kernabtrennung erfolgte, da zunächst festgestellt werden sollte, ob überhaupt eine Verbindungsbildung zwischen dem markierten Steroidhormon und einer Substanz aus der Lipidfraktion nachzuweisen war.

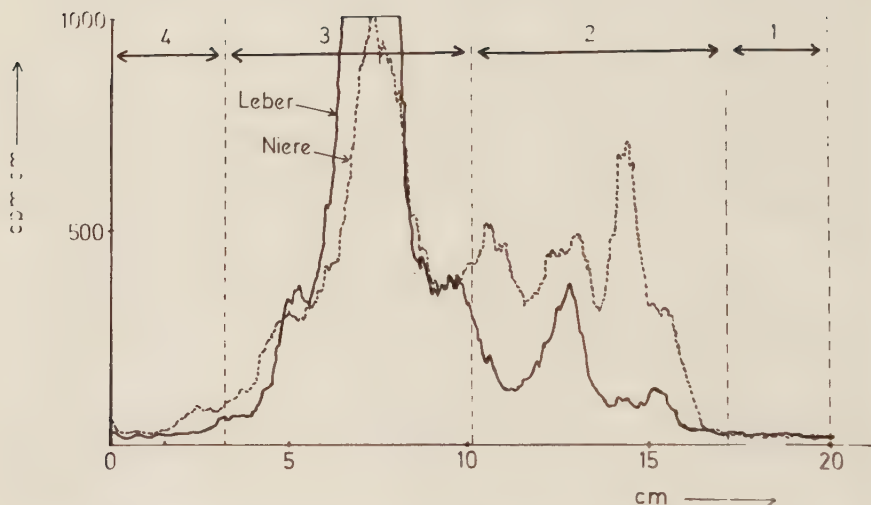


Abb. 7 : Radio-Dünnschichtchromatogramm der extrahierten Gesamtlipide aus Leber u. Niere; ohne vorherige Zellfraktionierung; 3 Stdn. nach i.p.-Injekt. von $50\mu\text{C}$ Testost.- $4\text{-}^{14}\text{C}$ ($500\mu\text{g}$) in eine 30 Tage alte, männliche Sprague-Dawley-Ratte; Kieselgel G nach Stahl; Entwicklung im 3-stufigen System (vgl. S. 25):
 n-Propanol/ NH_4OH (12,5 %) 80:20,
 1,2-Dichloräthan/Methanol 98:2,
 Chloroform/Eisessig 95:5;
 aufgetragene Menge je ca. 40 000 Zpm;

Man erkennt in der Abb. 7, daß der größte Teil der Aktivität im Bereich 3 auftritt, während im Bereich 4 kaum ^{14}C -Steroide zu finden sind. Will man annehmen, daß Verbindungen zwischen Phospholipiden und Testosteron(-Metaboliten) entstanden sein könnten, so muß man aus diesem Ergebnis ableiten, daß entweder nur wenige solcher Konjugate gebildet werden oder die Rf-Werte sich erheblich vergrößert haben oder solche Verbindungen sehr instabil sind. Natürlich ist auch eine Kombination dieser drei Fälle denkbar.

b) Weitere Auftrennung der Substanzen aus den Bereichen 1-4
durch Radio-Papierchromatographie

Aus jedem der 4 Bereiche des Radio-Dünnschichtchromatogramms wurden die lipoidlöslichen Substanzen eluiert und ihre weitere Auftrennung durch Papierchromatographie versucht.

In der Abbildung 8 (S. 60-61) sind die Radio-Papierchromatogramme zusammengestellt. Die Radioaktivitätsverteilung wurde, um eine größtmögliche Ausbeute zu erzielen, mit Hilfe des Flüssig-Szintillations-Spektrometers (FSS) bestimmt.

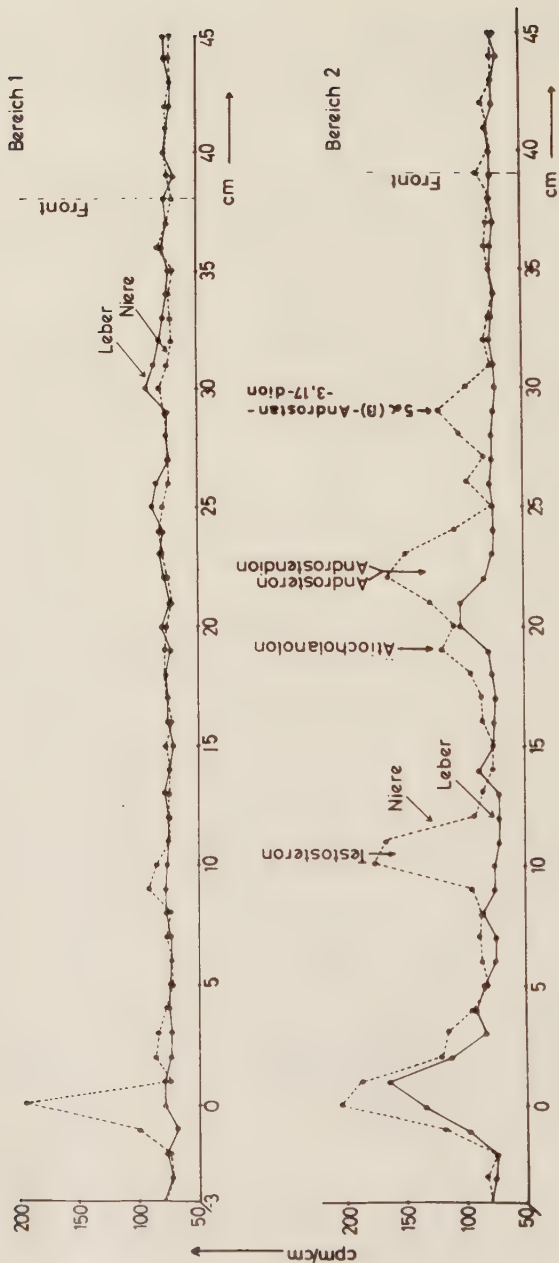
Wie schon aus dem Radio-Dünnschichtchromatogramm (Abb.7) ersichtlich, treten im Bereich 1 keine ^{14}C -Testosteron-Metabolite auf.

Im Bereich 2 sind alle diejenigen freien Metabolite zu erkennen, über die MOSEBACH u. M. schon in früheren Arbeiten berichteten (10, 31, 33) und die in dieser Arbeit nicht weiter von Interesse waren.

Die papierchromatographische Auftrennung des Bereiches 3 ergibt bei Leber- und Nierenextrakten ein verwandtes Bild. Bei der Niere sind jedoch Start- und End-Peak wesentlich kleiner im Verhältnis zu den beiden mittelständigen Peaks. Außerdem ist im Unterschied zur Leber der erste der beiden mittelständigen Peaks größer als der zweite. Diese letzte Beobachtung bedarf aber noch weiterer Untersuchung.

Im Bereich 4 (Phospholipide) konnten (vgl. Abb. 7) trotz Ausmessung im empfindlicheren FSS (s.S. 51) keine ^{14}C -aktivität nachgewiesen werden.

Abb. 8 : Radio-Papierchromatogramme der aus Leber- bzw. Nierengewebe extrahierten Lipide, eluiert aus den Bereichen 1 - 4 des zur Vortrennung angefertigten Dünnschicht-Chromatogramms (vgl. Abb. 7)



Systeme für:

Bereich 1 : Butan(1,3)diol - Methylcyclohexan 1:5

Bereich 2 : n-Heptan/Benzol/Methanol/Wasser 67:33:80:20

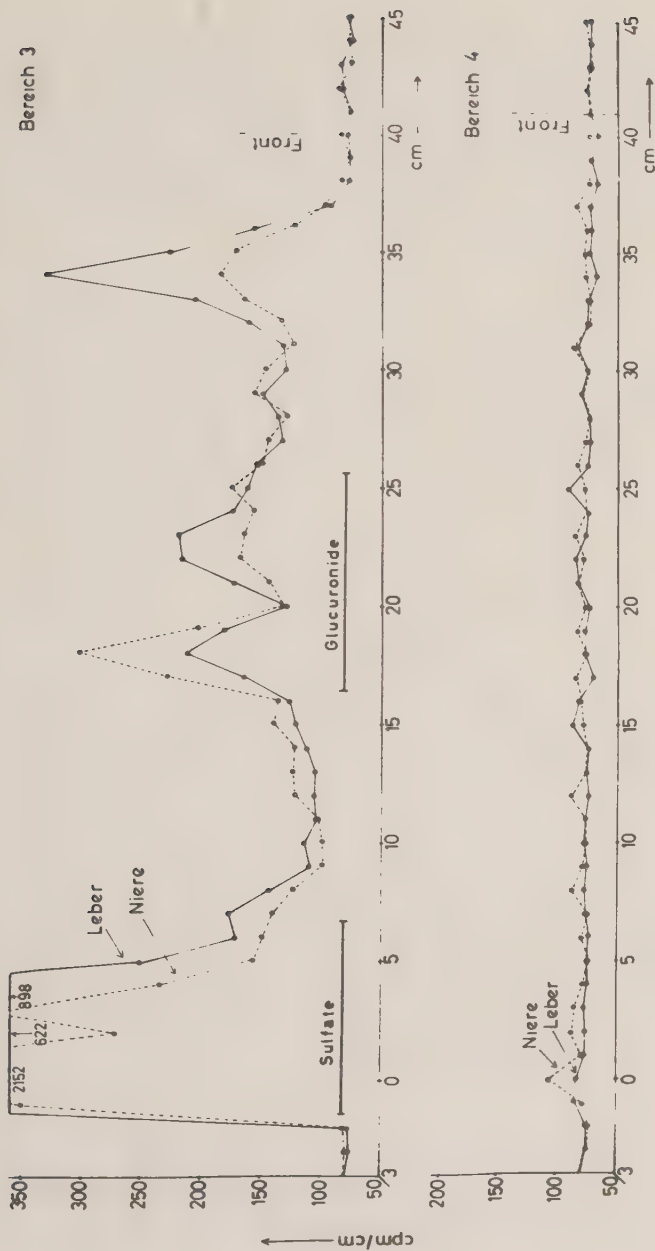


Abb. 8 : Systeme für:

Bereich 3 : Äthylazetat/Toluol/n-Hexan/III-Butylalkohol/Eisessig/Wasser

60:75:40:25:60:140

Bereich 4 : Äthylazetat/ n-Butanol/ NH_4OH /Wasser 9:1:1:9

Nach schwefelsaurer Hydrolyse der aus Bereich 3 der Abb. 7 (Leber) eluierten Substanzen (5 proz. H_2SO_4 , 1 Std., 80°) und erneuter dünn-schicht-chromatographischer Auftrennung des Hydrolysates mit dem bereits unter Abb. 7 beschriebenen, 3-stufigen System ergab sich nach Ausmessung mit dem Dünn-schicht-Scanner das in Abb. 9 wiedergegebene Bild der Radioaktivitätsverteilung

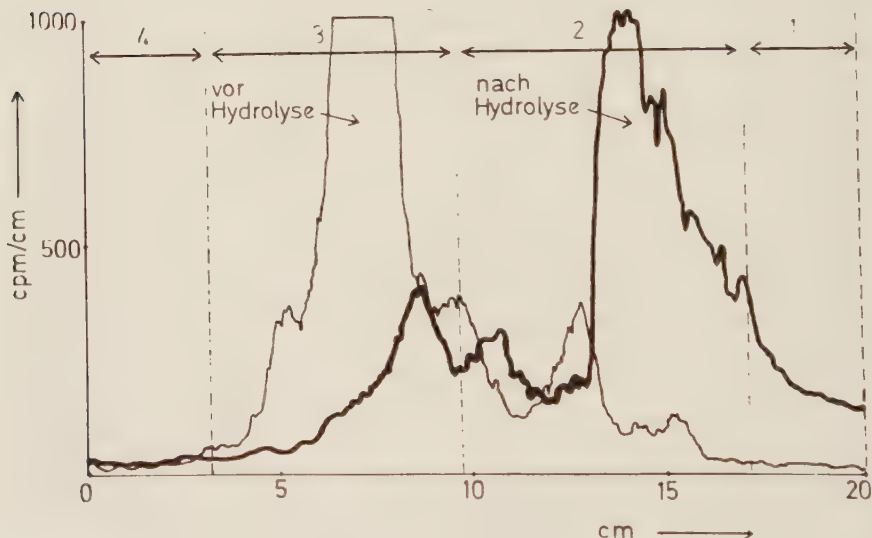


Abb. 9 : Radio-Dünnschichtchromatogramm der aus Bereich 3 der Abb. 7 (Leber) extrahierten und hydrolysierten (5 proz. H_2SO_4 , 1 Std., 80°) Metabolite von-Testosteron-4- ^{14}C (Konjugate); Bed. s. unter Abb.7

— vor Hydrolyse (vgl. Abb. 7)

— nach Hydrolyse

Die nunmehr im Bereich 2 der Abb. 9 auftretenden ^{14}C -Metabolite sowie die im Bereich 3 noch vorliegenden Substanzen wurden durch Papierchromatographie weiter untersucht.

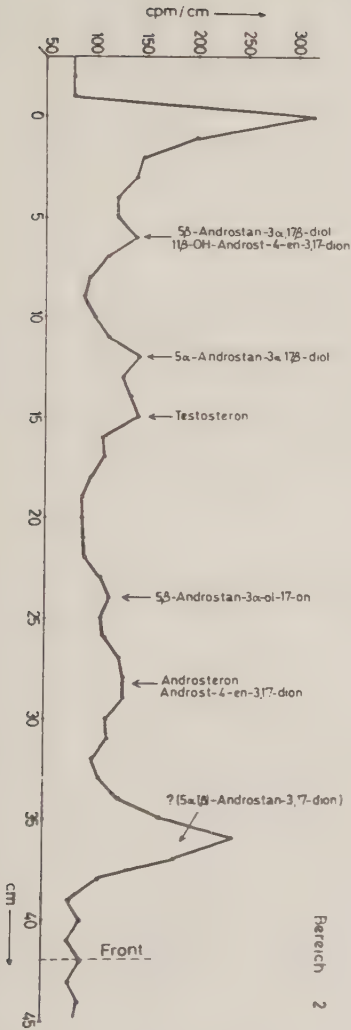


Abb. 10

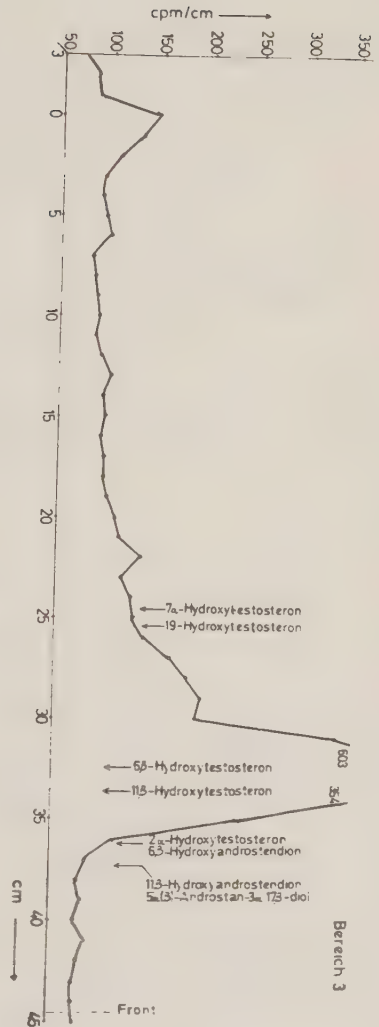


Abb. 11

Text siehe nächste Seite

Abb. 10 : Radio-Papierchromatogramm der durch schwefelsaure Hydrolyse (5 proz. H_2SO_4 , 1 Std., 80°) aus den Substanzen des Bereiches 3 der Abb. 7 (Leber) freigesetzten und nach Rechromatographie im selben dünn-schicht-chromatographischen System nun im Bereich 2 auftretenden ^{14}C -Metabolite des Testosterons; n-Heptan/Benzol/Methanol/Wasser 67:33:80:20, Whatman 2;

Abb. 11 : Radio-Papierchromatogramm der durch schwefelsaure Hydrolyse (s.o.) aus Bereich 3 der Abb. 7 (Leber) freigesetzten und nach Rechromatographie erneut im Bereich 3 auftretenden Substanzen; Papierchromatographie: Äthylazetat/Toluol/n-Hexan/III-Butanol/Eisessig/Wasser 60:75:40:25:60:140, Whatman 2;

Aus der Abbildung 10 (S. 63) ergibt sich, daß in den Konjugaten (Bereich 3 d. Abb. 7) relativ niederpolare Metabolite - mit 2 O-Atomen - vorkommen, wie sie auch als freie Metabolite im Bereich 2 auftreten.

Bei der wenig polaren, radioaktiven Zone mit dem R_f - Wert von $5\alpha(\beta)$ -Androstan-3,17-dion handelt es sich wahrscheinlich nicht um dieses selbst, sondern möglicherweise um ein Artefakt. Jüngste Ergebnisse von MOSEBACH (37) zeigen, daß bei vorsichtiger Solvolyse der Sulfate und Glucuronide keine radioaktive Zone im Bereich von $5\alpha(\beta)$ -Androstan-3,17-dion erscheint, während wesentlich höhere Aktivitäten bei Testosteron und Androsteron vorliegen. Die Identität dieser beiden Metabolite konnte durch umgekehrte Isotopen-Verdünnungstechnik gesichert werden.

Die große radioaktive Zone der Abbildung 9, die nach Hydrolyse im Bereich 2 auftritt, entstammt daher mit Sicherheit den beiden ^{14}C -Steroiden Testosteron und Androsteron; das gilt sowohl für Leber als auch für Niere.

Aus der Abbildung 11 (S. 63) ergibt sich, daß praktisch der gesamte Startpeak sowie große Teile der beiden mittelständigen Peaks, die nach papierchromatographischer Analyse der unhydrolysierten Verbindungen aus Bereich 3 der Abb. 7 auftreten (vgl. Abb. 8, Bereich 3), durch Hydrolyse verschwinden bzw. wesentlich kleiner werden d.h. Konjugate repräsentierten. MOSEBACH konnte kürzlich zeigen (37), daß es sich hierbei um Sulfate und Glucuronide handelt.

Der endständige Peak dürfte, da er weitgehend unverändert bleibt, im wesentlichen die freien Hydroxy-Produkte der beiden Δ_4 -3-oxo-Steroide Testosteron und Androstendion enthalten.

An der Aufklärung der erwähnten Konjugate wird am Bonner Institut noch gearbeitet, wobei das Verhältnis von Glucuroniden zu Sulfaten und die Art der konjugierten Steroide besondere Schwerpunkte darstellen.

c) Versuche mit Doppelmarkierung

aa) ^{14}C -Testosteron und ^{32}P -Phosphat

Im Rahmen dieser Arbeit war die Frage von besonderem Interesse, ob gemäß den Untersuchungen von OERTEL (40) ^{14}C -Metabolite des Testosterons oder Testosteron selbst Verbindungen mit Phospholipiden eingehen. Um dieses Problem gezielt anzugehen, wurde ein Versuch unter sonst gleichen Bedingungen wie bisher, jedoch unter gleichzeitigem Einsatz von ^{32}P -Phosphat durchgeführt. Derartige Doppelmarkierungs-Versuche ermöglichen es, Bindungsbildungen auch dann zu erfassen, wenn hierbei Produkte entstehen, deren Rf-Werte erheblich von denen der Komponenten differieren.

Einer 30 Tage alten, männlichen Sprague-Dawley-Ratte (70 g) wurden 1,6 mc ^{32}P -Orthophosphat in neutraler Lösung (1 ml Na-Cl-haltig) sowie nach 10 Minuten 100 μc

Testosteron-4- ^{14}C i.p. injiziert. Nach 3 Stunden erfolgte die Aufarbeitung der Leber in toto. Auf eine Trennung in Kern- und Cytoplasmafraktion wurde verzichtet, da zunächst ohne Berücksichtigung spezieller Lokalisationen an bestimmten Zellorganellen die Frage interessierte, ob überhaupt Bindungen zwischen ^{14}C -Steroiden und Phospholipiden nachweisbar waren.

Die Abbildung 12 zeigt das Radio-Dünnschichtchromatogramm der aus der Leber extrahierbaren freien Lipide. Die Empfindlichkeit des Dünnschicht-Scanners wurde so eingestellt, daß praktisch nur die ^{32}P -Aktivität erfaßt wurde. Eine gleichzeitige Registrierung von ^{32}P - und ^{14}C -Aktivität ist mit einem Radio-Dünnschichtchromatographen nicht möglich.

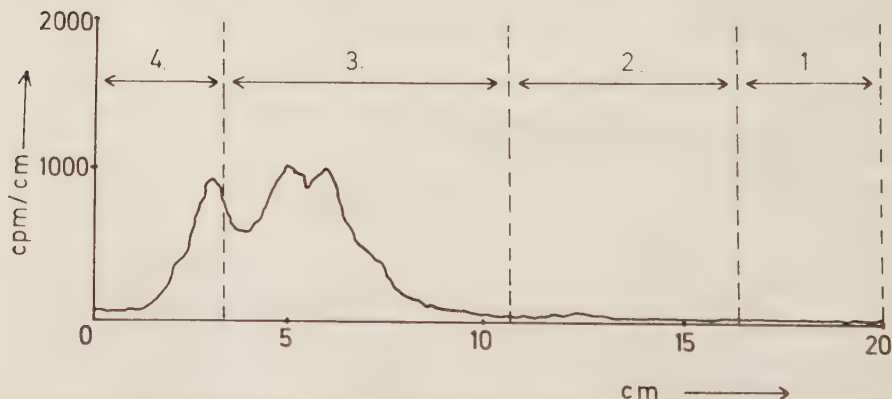


Abb. 12 : Radio-Dünnschichtchromatogramm eines Lipidextraktes aus der Leber einer 30 Tage alten, männlichen Sprague-Dawley-Ratte; 3 Stdn. nach i.p.-Injektion von 1,6 mc ^{32}P -Orthophosphat sowie 100 μc Testosteron-4- ^{14}C ; Entwicklung im 3-stufigen System: n-Propanol/ NH_4OH (12,5 %) 80:20, 1 Std. 1,2-Dichloräthan/Methanol 98:2, 1 1/2 Std. Chloroform/Eisessig 95:5, 1 1/4 Std. (vgl. S. 25) Empfindlichkeitseinstellung erfaßt nur ^{32}P ;

Die Substanzen der Bereiche 3 und 4 wurden zusammen eluiert und einer Hydrolyse mit äthanolischer Kalilauge (9) unterworfen (5 ml 0,1n äthanol. KOH, 10 Min., 37°), wodurch die Fettsäuren abgespalten werden konnten. Bindungen der Phosphorsäure mit Glycerin oder Basen bleiben hierbei geschont.

Nach Rechromatographie des Hydrolysates im gleichen dünn-schicht-chromatographischen System ergaben sich die in Abbildung 13 wiedergegebenen Verhältnisse:

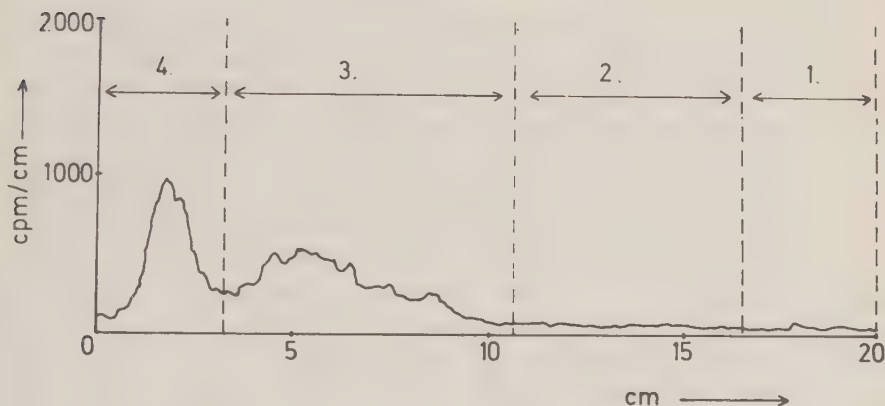


Abb. 13 : Radio-Dünnschichtchromatogramm der aus Abb. 12 eluierten Bereiche 3 u. 4 nach Hydrolyse (5 ml 0,1n äthanol. KOH, 10 Min., 37°); Entwicklung wie unter Abb. 12 beschrieben;

Durch Hydrolyse treten im Bereich 4 mehr und polarere ^{32}P -Metabolite auf als vor der Hydrolyse vorlagen. Die nächstliegende Erklärung wäre die, daß aus relativ unpolaren Phosphatiden mit ^{32}P -Aktivität Fettsäuren abgespalten wurden und dabei polarere Vorstufen dieser Phosphatide entstanden sind. Über die Natur solcher Phosphatide kann jedoch noch nichts ausgesagt werden, da alle bekannteren Phosphatide im hochpolaren Bereich 4 vorliegen. Neuere Untersuchungen von MOSEBACH (37) über lipo-

phile Konjugate von Testosteron-Metaboliten zeigten, daß diese Fraktion in vielen Organen einen hohen Anteil an den Gesamt-Konjugaten besitzt. Mit OERTEL darf man daher annehmen, daß die lipophile Komponente solcher Steroide auch Phosphorsäure bzw. ^{32}P -Phosphat enthält. Letztere sollen weniger polar als freie Phosphatide sein, so daß die hier erhobenen Befunde auch auf einer Polarisierung solcher Steroid-Phosphatide durch Fettsäureabspaltung beruhen könnten.

Aus einem Dünnschichtchromatogramm der Gesamtlipidextrakte (Abb. 12) wurden die radioaktiven Metabolite des Bereiches 3 ohne vorherige Hydrolyse in verschiedenen papierchromatographischen Systemen untersucht. Es sollte dadurch festgestellt werden, ob unabhängig von der Wahl des chromatographischen Systems radioaktive Zonen mit exakt übereinstimmenden ^{14}C - und ^{32}P -Aktivitäten nachweisbar waren, was auf das Vorkommen phosphathaltiger Testosteron- bzw. Testosteron-Metabolit-Verbindungen hätte schließen lassen.

Die Radio-Papierchromatogramme wurden, wie im method. Teil beschrieben (s.S. 49), in 1 cm breite Streifen geschnitten, deren Aktivitätsgehalt unmittelbar im FSS ausgemessen wurde. Die ^{14}C - und ^{32}P -Aktivität konnte in zwei verschiedenen Kanälen des Tri-Carb Liquid-Scintillation-Spectrometer (Model 314 E, Packard) getrennt bestimmt werden. Bei einer Spannung von 1270 V haben sich folgende Diskriminator- und Empfindlichkeits-Einstellungen für unser Gerät bewährt:

	linker Diskriminator : 100	
Kanal I :	rechter Diskriminator : 250	für ^{14}C
	Empfindlichkeit (gain): 900	(+ ^{32}P)
	linker Diskriminator : 100	
Kanal II :	rechter Diskriminator : 750	für ^{32}P
	Empfindlichkeit (gain): 100	

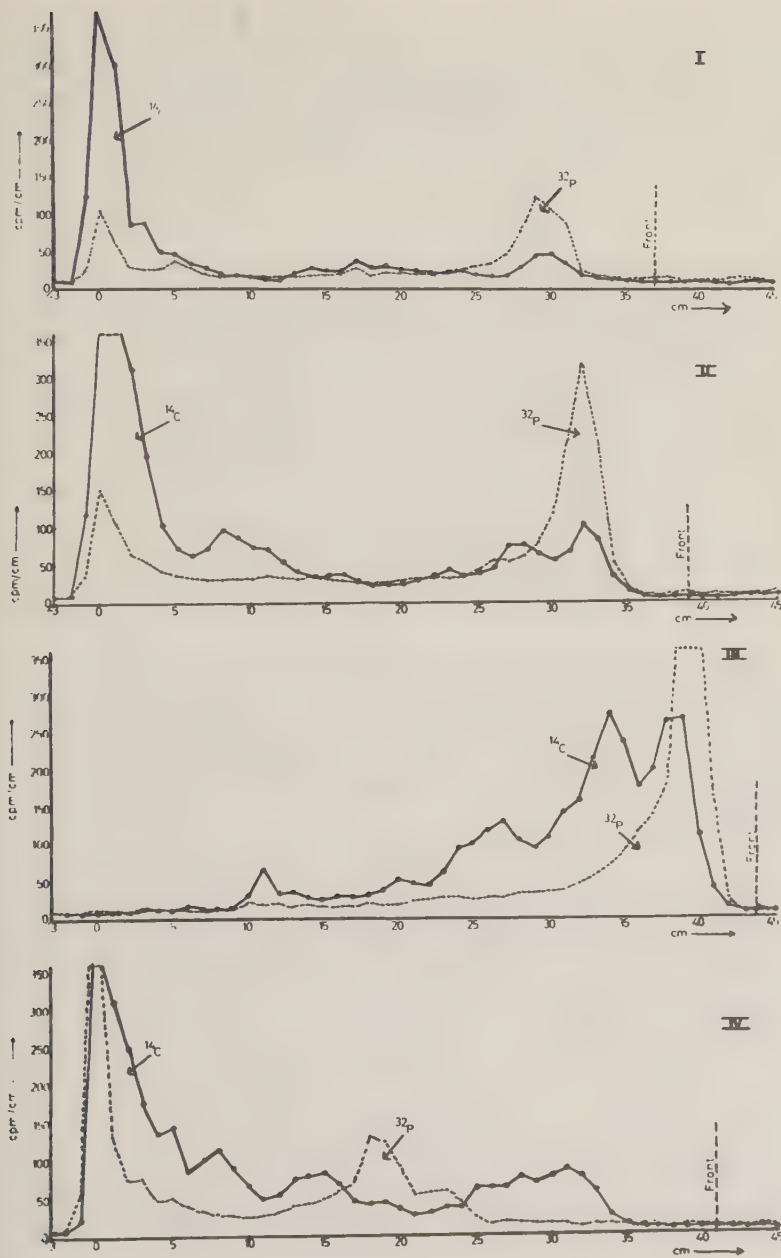


Abb.14
Text s.
S. 70

Die Abbildung 14 bringt eine Zusammenstellung einiger Radio-Papierchromatogramme jener Substanzen, die nach Dünnschichtchromatographie der Gesamtlipidextrakte der Leber aus den Bereichen 3 (vgl. Abb. 12) eluiert und unhydrolysiert in verschiedenen Systemen entwickelt wurden.

Abb. 14 : Radio-Papierchromatogramme der aus den Bereichen 3 der Dünnschichtchromatogramme (vgl. Abb. 12) eluierten, nicht hydrolysierten Verbindungen in folgenden Systemen:

- I Äthylazetat/Toluol/n-Hexan/III-Butylalkohol/
Eisessig/Wasser 60:75:40:25:60:140
- II n-Butyläther/n-Butanol/Eisessig/Wasser
130:70:60:140
- III n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5
- IV Äthylazetat/n-Butanol/NH₄OH/Wasser 9:1:1:9

Man erkennt, daß im Endbereich der Chromatogramme eine radioaktive Zone auftritt, deren ¹⁴C- und ³²P-Aktivität bei Entwicklung in sauren Systemen gut übereinstimmt, nicht jedoch bei Verwendung eines basischen Systems.

Daraus läßt sich ableiten, daß es unter Verwendung saurer Chromatographie-Systeme entweder tatsächlich gelungen ist, Bindungen zwischen ³²P- und ¹⁴C-haltigen Lipidkomponenten nachzuweisen, oder aber, daß die Rf-Werte von ¹⁴C-Steroid-Verbindungen zufällig bei allen drei sauren Trennsystemen mit denen von ³²P-Phospholipiden übereinstimmen. Besonders berücksichtigt sei die Möglichkeit, daß es sich bei den ¹⁴C-Steroid-Phospholipiden um sehr lockere Verbindungen handelt, die im basischen Milieu eine hydrolytische Spaltung erfahren. Hierfür sprechen auch die in Abb. 12 und 13 erfaßten Ergebnisse. Welcher Art eine solche Bindung zwischen Testo-

steron-Metaboliten und Phospholipiden sein könnte und zwischen welchen Komponenten sie eventuell zustande kommt, konnte noch nicht geklärt werden.

bb) ^{14}C -Testosteron und ^{35}S -Sulfat

Ein weiterer Doppelmarkierungs-Versuch wurde mit ^{35}S -Sulfat und Testosteron-4- ^{14}C durchgeführt. Nach OERTEL (40) entstehen neben Glucuroniden und Sulfaten auch "lipophile" Konjugate, die schwefelhaltig sind. Er vermutet, daß es sich um Sulfatide handelt. Da prinzipiell als bindende Proteine auch Lipoproteide in Frage kommen, erschien es interessant, zu prüfen, ob unter den geschilderten Versuchsbedingungen S-haltige, lipophile Konjugate des Testosterons als Bestandteil von Lipoproteiden isoliert werden konnten.

Bei diesem Doppelmarkierungs-Versuch bestand nicht die Möglichkeit der getrennten Analyse von ^{14}C - und ^{35}S -Aktivität mit Hilfe der Mehrkanal-Flüssig-Szintillations-Spektrometrie, da die Beta-Energien zu ähnlich sind. Somit konnte nur die unterschiedliche Halbwertszeit dieser beiden Nuklide ausgenutzt werden ($^{14}\text{C} = 5568 \text{ a}$; $^{35}\text{S} = 87 \text{ d}$).

Es wurde versucht, durch Verfolgung der Aktivitäten über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr festzustellen, welche radioaktiven Zonen der Chromatogramme ihre Aktivität beibehalten, welche im Sinne der ^{35}S -Halbwertszeit abfallen bzw. welche gegen eine endliche Aktivität konvergieren.

Bei einem solchen Versuch, bei dem $50 \mu\text{c}$ Testosteron-4- ^{14}C und 1 mc ^{35}S -Sulfat injiziert wurden, stellte sich heraus, daß bei diesem Aktivitätsverhältnis der ^{35}S -Anteil in den Steroid-Sulfaten und sulfathaltigen

lipophilen Steroid-Konjugaten noch viel zu gering war. Auf eine Wiederholung solcher Versuche wurde nicht nur wegen des Zeitbedarfs sondern auch wegen der zu kostspieligen Notwendigkeit verzichtet, mindestens 10 mc ^{35}S -Sulfat einsetzen zu müssen.

In jüngster Zeit hat MOSEBACH (37) diese Versuche unter anderen Bedingungen wiederholt:

Die ^{35}S -Aktivität wurde 1/2 Stunde vor Testosteron injiziert. Anstelle von ^{14}C -Testosteron wurde Testosteron-1,2- ^3H verwendet, so daß die Möglichkeit gleichzeitiger Messung in mehreren Kanälen des FSS bestand.

Hierbei zeigte sich neben der Tritium-Aktivität ^{35}S -Aktivität in der Sulfat-Fraktion und auch in der Fraktion der lipophilen Konjugate (die Maxima von ^3H und ^{35}S lagen exakt zusammen). Die Glucuronid-Fraktion wies, wie zu erwarten war, keine ^{35}S -Aktivität auf.

3 Radioaktivität der Proteinfraction

a) ^{14}C -Steroid-Bindungen an Eiweiß aus Kernen und cytoplasmatischem Überstand

Von besonderem Interesse ist ein Vergleich der an Eiweiß gebundenen ^{14}C -Steroid-Aktivitäten mit der Gesamt-Aktivität der Zelle (freie und gebundene Aktivität). Hierzu sei zunächst eine Tabelle angeführt, die sich auf 10-Minuten-Versuche bezieht:

		Gesamtaktivität Zpm/g Gewebe	Proteingebundene Aktivität Zpm/g Gewebe	relat. Aktivitäts- anteil der Proteine %
Leber	Kerne	35 180	1330	3,76
	Cytopl.	148 940	1340	0,9
Niere	Kerne	23 600	180	0,76
	Cytopl.	49 160	290	0,31

Tab. 4 : Prozentualer Anteil der proteingebundenen Radioaktivitäten an den Gesamtaktivitäten bei Kern- und Cytoplasma-Fraktion von Leber- und Nierenzellen, 10 Min. nach i.p.-Injektion von $50\mu\text{C}$ Testosteron-4- ^{14}C ($500\mu\text{g}$) in 30 Tage alte, männliche Sprague-Dawley-Ratten (Mittelwerte aus 2 Versuchen);

Der prozentuale Anteil der proteingebundenen Radioaktivität ist bei beiden Organen in den Kernen größer als im

Cytoplasma; er beträgt bei der Leber das 4,3-fache, bei der Niere das 2,3-fache. Dieses Ergebnis spricht für eine größere Affinität des Hormons bzw. seiner Metabolite zu den Kernproteinen als zu den Cytoplasmaproteinen.

Hierbei muß noch folgender Gesichtspunkt berücksichtigt werden:

Wie bei früheren Arbeiten von MOSEBACH u. RATH (33) festgestellt wurde, bevorzugen die hochpolaren Metabolite des Testosterons speziell in der Leber die Cytoplasmafraktion. Da die proteingebundenen Metabolite ebenfalls hochpolar sind (vgl. S. 38 ff) und von Kernproteinen bevorzugt gebunden werden, ist es nicht ausgeschlossen, daß für einen ganz bestimmten Typ hochpolarer Metabolite im Kern spezifische Rezeptoren existieren.

Die in Tabelle 5 aufgeführten Werte eines 180-Minuten-Versuches ergeben ein ähnliches Bild:

		Gesamtaktivität Zpm/g Gewebe	Proteingebundene Aktivität Zpm/g Gewebe	relat. Aktivitäts- anteil der Proteine %
Leber	Kerne	33 000	2680	8,1
	Cytopl.	30 830	1260	4,1
Niere	Kerne	16 730	2 390	14,3
	Cytopl.	70 400	3670	5,2

Tab. 5 : Proz. Anteil d. proteingeb. Radioakt. an den Gesamtaktivitäten pro g Gewebe bei Kern- u. Cytopl.-frakt. von Leber u. Niere; 180 Min. nach i.p.-Injekt. von 50 μ c Testosteron-4-¹⁴C (männl. Ratte);

An diesem Ergebnis sind zwei Tatsachen zu erkennen: Erstens sind die Prozentzahlen auch nach 3-stündiger Versuchszeit bei der Kernfraktion höher als bei der Cytoplasmafraktion. Zweitens liegen beide Prozentzahlen höher als bei den 10-Minuten-Versuchen. Dieses Anwachsen mit der Versuchszeit ist ein unmittelbarer Beweis für eine beträchtliche Bindefestigkeit der Steroid-Metabolite an die Proteine aber auch dafür, daß es sich bei den Protein-Steroid-Komplexen nicht um Artefakte handelt.

Man muß jedoch auch daran denken, daß die zur Proteinbindung besonders befähigten Metabolite relativ langsam gebildet werden könnten; denn nicht nur die relativen, sondern auch die absoluten Werte (Zpm/g Gewebe) steigen mit zunehmender Versuchszeit an.

Wenn man die physiologische Dosis überschreitet, übersteigt der prozentuale Anteil der eiweißgebundenen Testosteron-Metabolite in der Cytoplasmafraktion den in der Kernfraktion:

		Gesamtaktivität Zpm/g Gewebe	Proteingebundene Aktivität Zpm/g Gewebe	relat. Aktivitätsant. der Proteine %
Leber	Kerne	456 330	63 330	13,8
	Cytopl.	199 620	57 620	28,8
Niere	Kerne	113 990	7 990	7,0
	Cytopl.	84 630	12 630	15,0

Tab. 6 : Proz. Anteil d. proteingeb. Radioakt. an den Gesamt-Aktivitäten pro g Gewebe bei Kern- u. Cytoplasma-Frakt. von Leber u. Niere; 180 Min. nach i.p.-Injekt. von 300 μ c Testosteron-4-¹⁴C in 30 Tage alte, männliche Sprague-Dawley-Ratten.

Möglicherweise haben Kernproteine eine geringere Kapazität für überschüssige Metabolitmengen als Cytoplasmaproteine. Diese Beobachtung scheint den in Tab. 3 (S. 55) wiedergegebenen Ergebnissen zu widersprechen. Es ist jedoch zu bedenken, daß es sich bei Tab. 3 um die extrahierbare ^{14}C -Steroid-Aktivität und hier um die proteingebundene handelt. Unter Umständen würde dieser scheinbare Widerspruch bedeuten, daß der Kern eine große Kapazität für lockere Bindungen (auch an Proteine) besitzt, jedoch die schon erwähnte geringe für feste Bindungen. Für das Cytoplasma gilt das Umgekehrte.

Die Anreicherung von proteingebundener Aktivität im Kern mit zunehmender Versuchsdauer gilt auf alle Fälle lediglich für physiologische Hormondosen.

Wenn man den Bindungen des Hormons an spezifische Proteine (z.B. Histone) besondere physiologische Bedeutung zukommen lassen will, wären die Ergebnisse der Tabellen 4 und 5 von erheblichem Interesse.

b) Abtrennung ^{14}C -Steroid-bindender Peptide und Aminosäuren

Auf die Isolierung derjenigen Proteinfraktionen aus Kernen und Cytoplasma, die zu einer festen Bindung radioaktiver Testosteron-Metabolite besonders befähigt waren, mußte in dieser Arbeit wegen der sehr schwierigen Trennung der Organproteine verzichtet werden.

Umsomehr interessierte die Frage, ob bestimmte Aminosäuren oder Aminosäure-Gruppierungen in den verschiedenen Testosteron-Metabolit-bindenden Proteinen der erwähnten Fraktionen vorliegen, die als spezifische Bindungsorte angesehen werden können.

Es war, wie schon anfangs ausgeführt wurde, selbstverständlich, daß bei der Hydrolyse solcher Proteine nur der

Einsatz von Proteasen sinnvoll war, da möglichst viele Aminosäure-Steroid-Bindungen erhalten bleiben sollten. Als beste Protease bezüglich der Ausbeute an Spaltprodukten gilt heute die aus *Streptomyces griseus* gewonnene "Pronase".

Bei der im method. Teil beschriebenen Hydrolyse mit Pronase (s.S. 31) und anschließenden papier-chromatographischen Entwicklung des Hydrolysates im System n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 ergaben sich die in Abbildung 15 dargestellten Verhältnisse.

Es sind drei radioaktive Zonen zu erkennen: A, B und C. Die dritte Zone (C) liegt in einem Bereich, der kein ninhydrinpositives Material enthält. Hierbei handelt es sich um ^{14}C -Metabolite, die während der enzymatischen Hydrolyse freigesetzt wurden (Einschlüsse und sehr lockere Verbindungen).

Besonders bei der Niere läßt sich deutlich erkennen, daß bei der enzymatischen Spaltung der Kern-Proteine weniger freie ^{14}C -Metabolite auftreten als bei der Proteolyse der Cytoplasmaproteine. Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse der Tabelle 5, nach der bei Einsatz physiologischer Hormondosen die Kernproteine einen größeren Prozentsatz der Gesamt-Metabolite binden als die Cytoplasmaproteine.

Die eng hintereinanderliegenden beiden ersten Zonen (A u. B) - bei Nierencytoplasma ist der erste der beiden Peaks nur andeutungsweise zu erkennen - erwiesen sich als ninhydrinpositiv. Die Zentren aller drei Peaks wurden eluiert und jeweils Anteile dieses Eluates im gleichen System rechromatographiert.

Wie ein Beispiel (Leber-Kernprotein) zeigt (Abb. 16, auf S. 79), erhält man hierbei ebenfalls drei getrennte radioaktive Zonen, wobei allerdings die mittlere (B) einen größeren Rf-Wert aufweist als im Falle gemeinsamer Chromatographie.

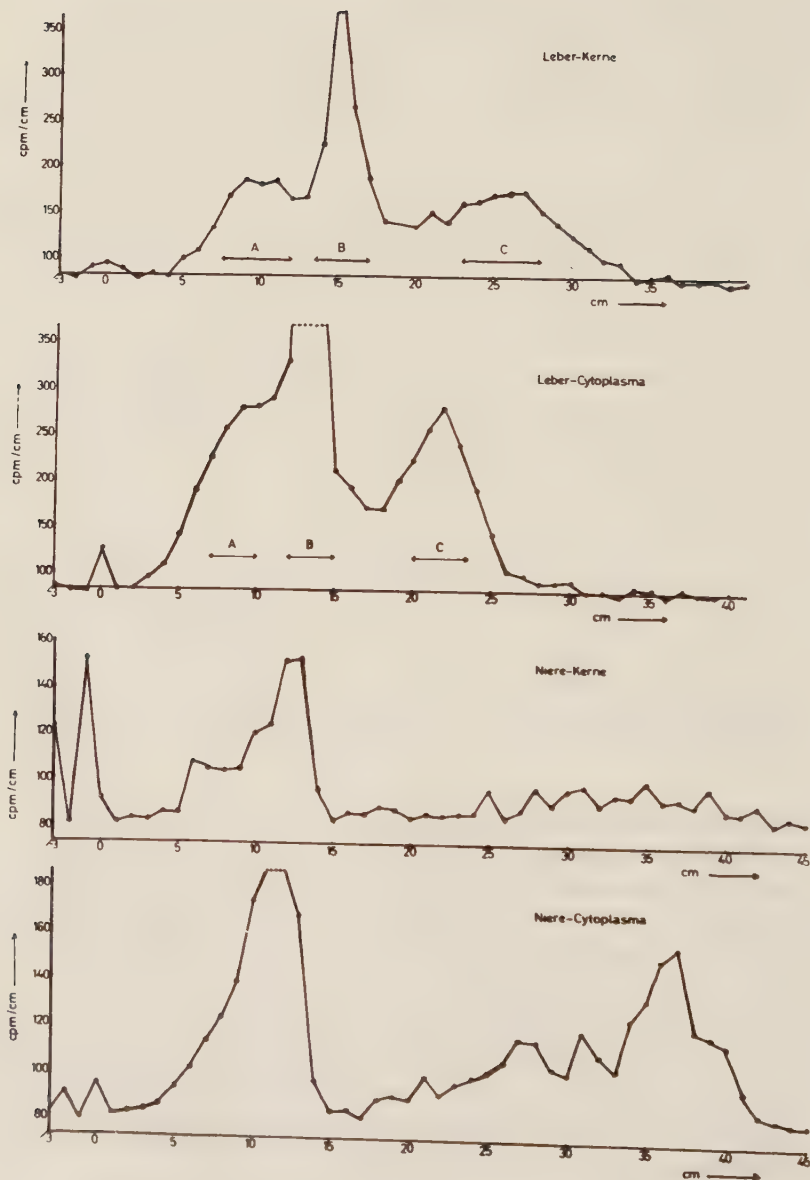


Abb. 15 : Text s. nächste Seite

Abb. 15 : Radiopapierchromatogramme der mit "Pronase" hydrolysierten Eiweiße aus Kern- und Cytoplasmafraktionen von Leber- und Nierenzellen; 180 Min. nach i.p.-Injektion von $50\mu\text{C}$ Testosteron-4- ^{14}C ($500\mu\text{g}$) in eine 30 Tage alte, männliche Sprague-Dawley-Ratte; 50 mg Protein + 0,5 mg Pronase in 5 ml 0,1m Na-Azetat-Puffer pH 7,4; 40° , 48 Stdn.; n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5, absteigend, 20 Stdn.; ca. 15 mg Hydrolysatsmenge auf 3 cm Startlinie;

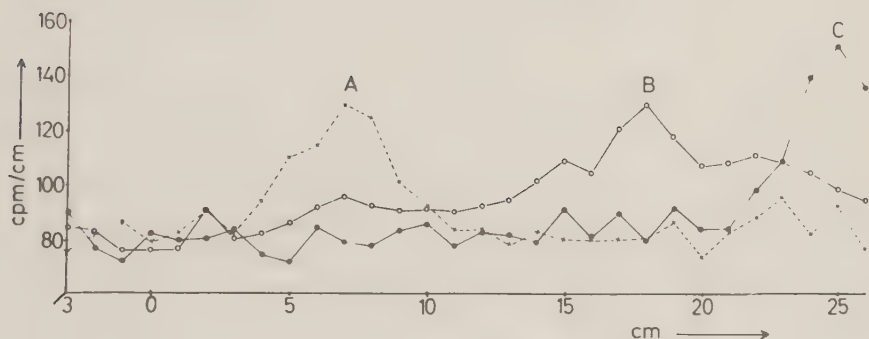


Abb. 16 : Rechromatographie der radioaktiven Zonen A, B und C aus Abb. 15 (Leber-Kernprotein); Bed. wie unter Abb. 15, jedoch nur 15-stündige Laufzeit mit $1/4$ der Eluate; Whatman 2 !

Von den aus den Peaks A, B und C der Abb. 15 eluierten Substanzen wurde ein weiteres Aliquot salzsauer hydrolysiert (6n-HCl , 24 Stdn., 110°). Nach Papierchromatographie der Hydrolyseprodukte und Ausmessung der ^{14}C -Aktivität im FSS ergab sich das in Abbildung 17 wiedergegebene Bild der Radioaktivitätsverteilung.

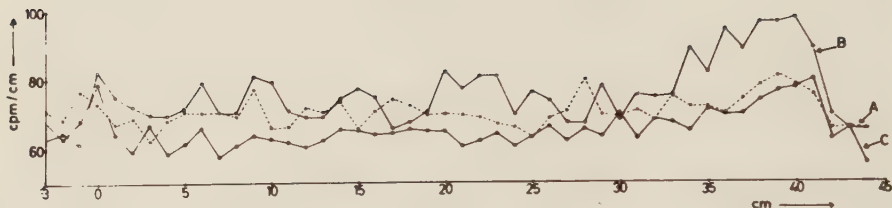


Abb. 17 : Radio-Papierchromatogramme der salzsauer hydrolysierten Substanzen (je 1/4 der Eluatmenge) aus den Peaks A, B und C der Abb. 15 (Leber-Kernprotein); 6n-HCl, 24 Stdn., 110°; n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5, absteigend, 20 Stdn.;

Die Tatsache, daß nunmehr die radioaktiven Zonen praktisch nur in Frontnähe der Chromatogramme auftreten, beweist, daß die Salzsäure im Falle der Peaks A und B zur Abspaltung von peptid-gebundenen ^{14}C -Steroiden geführt hat. Lediglich bei Peak B bleibt eine kleine radioaktive Zone bei mittleren Rf-Werten erhalten, die entweder als Sekundäreffekt (adsorptive Bindungen beim Eindampfen des Hydrolysates) zu werten ist oder einen Anteil einer besonders festen Aminosäure-Steroid-Verbindung repräsentiert. Die Lage der Substanzen aus Peak C blieb natürlich unverändert, da es sich hierbei, wie schon erwähnt, um freie ^{14}C -Testosteron-Metabolite handelte.

Die nach "Pronase"-Hydrolyse teilweise freigesetzten ^{14}C -Steroide wurden auch in einigen Fällen direkt aus der Hydrolysatlösung ätherextrahiert. Nach Chromatographie dieser Extrakte im Partridge-System ergab sich stets das in Abbildung 18/1 wiedergegebene Bild der Radioaktivitätsverteilung (vgl. auch Abb. 4 A: Ätherextrakt nach HCl - Hydrolyse). Ninhydrin-positive Strukturen waren nicht nachweisbar.

Die nach Ätherextraktion verbliebene Hydrolysatlösung enthielt somit die an Proteinbausteine gebundene Aktivität noch quantitativ. Eine weitere Anreicherung bzw. Auftrennung durch Dialyse (Visking-Dialysierschlauch, 2 x 12 Std. gegen je 250 ml H_2O , Magnetrührer) gelang nicht. Die Aminosäure-Steroid-Verbindungen diffundierten gemeinsam mit niedermolekularem, inaktiven Material ins Außendialysat (Abb. 18/2). An den im Innern des Dialysierschlauches verbliebenen, großmolekularen Restpeptiden und -Proteinen ließ sich keine Aktivität nachweisen (Abb. 18/3).

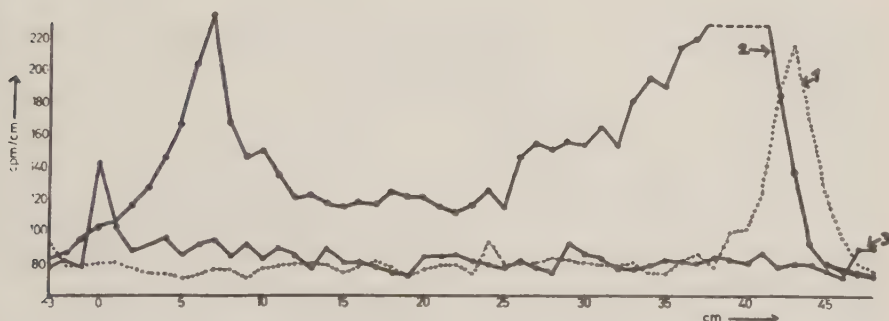


Abb. 18 : Radio-Papierchromatogramme der nach "Pronase"-Hydrolyse, Ätherextraktion und Dialyse der Spaltprodukte erhaltenen Fraktionen nach Einsatz von 50 mg Leberprotein einer 30 Tage alten, männlichen Sprague-Dawley-Ratte; 180 Min. nach i.p.-Injektion von $100 \mu c$ Testosteron-4- ^{14}C ; Dialyse: Visking-Schlauch, 2 x 12 Std. gegen 2 x 250 ml dest. H_2O , Magnetrührer; PARTRIDGE-System;

- 1 Testosteron-Metabolite des Ätherextraktes,
- 2 niedermolekulare Hydrolyse-Produkte im Außendialysat,
- 3 Restpeptide und -proteine im Innendialysat;

Um eine genauere Zuordnung von ^{14}C -Aktivität zu Proteinbausteinen zu ermöglichen, wurden Proteinproben eines weiteren Versuches zweistufig enzymatisch abgebaut. Zunächst erfolgte wiederum die enzymatische Hydrolyse mit "Pronase". Nach papierchromatographischer Trennung im Partridge-System wurden die Substanzen der unscharf voneinander abgegrenzten Zonen A und B (vgl. Abb. 15) gemeinsam eluiert, das Eluat eingedampft und eine zweite enzymatische Hydrolyse mit Leucinaminopeptidase (LAP; 15) vorgenommen. Das nach Papierchromatographie im gleichen System erzielte Ergebnis ist in der Abbildung 19 dargestellt:

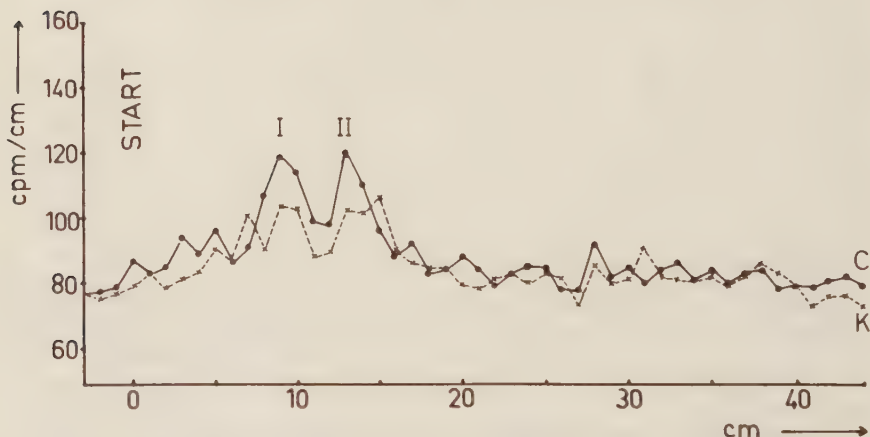


Abb. 19 : Radio-Papierchromatogramm der aus den radioaktiven Zonen A und B (vgl. Abb. 15) eluierten Substanzen nach LAP-Hydrolyse; Bed. für die vorausgegangene Pronase-Hydrolyse siehe unter Abb. 15; jedoch Verwendung von **K**ern- und **C**ytoplasma-Prot. (Leber) eines 180-Min.-Versuches mit $300\mu\text{c } ^{14}\text{C}$ -Testosteron; Bed. für LAP-Hydrolyse: Verhältnis von Peptiden zu Ferment ca. 100:1, 5 ml 0,005m Tris-Puffer pH 8,5, 0,005m MgCl_2 , 24 Stdn., 40° ; n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5, abst., 20 Stdn.

Auf diese Weise konnte sicher gezeigt werden, daß, wie sich schon nach einfacher "Pronase"-Hydrolyse andeutete (Abb. 15), im interessierenden Eiweiß mindestens 2 ^{14}C -Steroid-bindende Aminosäure- bzw. Peptid-Fraktionen (in Abb. 19 als Zone I und II gekennzeichnet) vorliegen müssen, die bei enzymatischen Hydrolysen erhalten bleiben.

Die ninhydrin-positiven, radioaktiven Zonen auf dem Chromatogramm decken sich scharf mit UV-positiven Zonen. Ob dieser Beobachtung Bedeutung zukommt, kann zur Zeit noch nicht beurteilt werden.

c) Versuche zur Strukturaufklärung der ^{14}C -Steroid-Bindungs-orte am Eiweiß

Um festzustellen, welche Aminosäuren in den ^{14}C -Steroid-bindenden Aminosäure- bzw. Peptid-Fraktionen d.h. in den Zonen I und II der Abb. 19 enthalten sind, wurden diese einzeln eluiert, zur Aufspaltung der restlichen Peptide mit 6N-HCl in üblicher Weise hydrolysiert (s.S. 35) und das Hydrolysat am Aminosäure-Analyzer entwickelt. Zur Kontrolle wurden bei einem Versuch Aliquots des Hydrolysates nicht nur am TECHNICON-AUTO-ANALYZER sondern auch am noch empfindlicheren BECKMAN-ANALYZER untersucht.⁺

Die Abbildung 20/I zeigt das Aminosäure-Spektrum, das sich regelmäßig reproduzieren ließ und für Leber und Niere sowohl für die Zonen I als auch für die Zonen II bei den Kern- ebenso wie bei den Cytoplasma-Proteinen nahezu gleich war.

⁺ Die Kontrollanalyse wurde freundlicherweise von Prof. Dr. G. Krampitz am Institut für Anatomie und Physiologie der Haustiere ausgeführt.

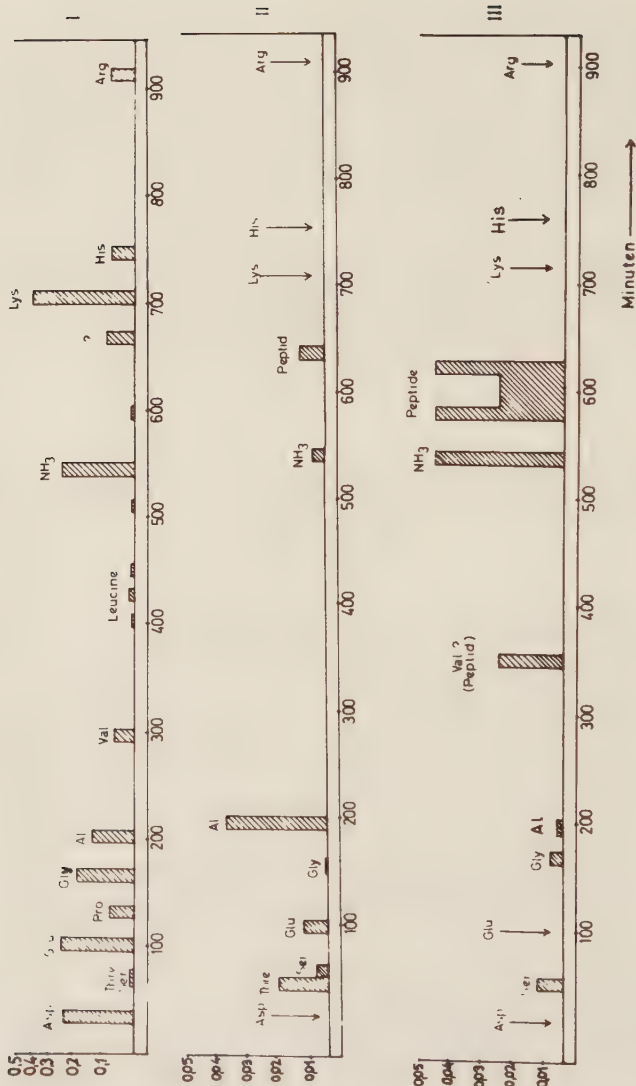


Abb. 20 : Text s. 85

Abb. 20/I : Aminosäure-Spektrum eines ^{14}C -Steroid-bindenden Peptid-Aminosäure-Gemisches nach HCl-Hydrolyse; die verwendete Fraktion entstammt einer Zone I (vgl. Abb. 19), die nach doppelter enzymatischer Hydrolyse (Pronase; Leucin-aminopeptidase) und zwischen- und nachgeschalteter Papierchromatographie (Partridge-System) erhalten wurde; Leberprotein einer 30 Tage alten, männlichen Sprague-Dawley-Ratte; 180 Min. nach i.p.-Injektion von $100\text{ }\mu\text{C}$ Testosteron-4- ^{14}C (spez. Aktivität 29 mc/mM);

Abb. 20/II: Aminosäure-Spektrum der aus der radioaktiven (Text S.37) Zone I (vgl. Abb. 19) eluierten Substanzen ohne vorherige HCl-Hydrolyse; $1/4$ d. Eluates am TECHNICON-AUTO-ANALYZER entwickelt; Leber-Kern-Protein nach doppelter enzymatischer Hydrolyse (Pronase; LAP) und zwischen- und nachgeschalteter Papierchromatographie (Bed. wie unter Abb. 15 und 19);

Abb.20/III: Aminosäure- und Peptid-Spektrum der aus der (Text S.37) radioaktiven Zone II (vgl. Abb. 19) eluierten Substanzen ohne vorherige HCl-Hydrolyse; alle Bed. wie bei Abb. 20/II;

Nach salzsaurer Hydrolyse der aus den ^{14}C -Steroid-haltigen, ninhydrin-positiven Zonen I und II eluierten Verbindungen wurde nach Entwicklung der Spaltprodukte am Aminosäure-Analyzer auch die quantitative Bestimmung der Aminosäuren an Hand der Extinktionswerte vorgenommen. Die Tabelle 7 enthält die in einem repräsentativen Versuch gefundenen Aminosäuremengen in μMol :

	μ Mol	relat. Verh.		μ Mol	relat. Verh.
Asp	0,30	2,5	Val	0,13	1,0
Thre	Spur	—	Ileu	Spur	—
Ser	Spur	—	Leu	Spur	—
Glu	0,35	3,0	NH ₃	1,16	
Pro	0,08	0,7	Lys	0,34	2,8
Gly	0,30	2,5	His	0,06	0,5
Al	0,28	2,3	Arg	0,12	1,0

Tab. 7 : Quantitative Bestimmung der Aminosäure-Zusammensetzung der Verbindungen aus der ¹⁴C-Steroid-haltigen, ninhydrin-positiven Zone I (d. Abb. 19) nach HCl-Hydrolyse und Entwicklung des Hydrolysates am Aminosäure-Analyzer (vgl. auch Abb. 20/I); Bed. s. unter Abb. 20/I; Relativzahlen für Arg=1;

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, liegen die beiden sauren Aminosäuren (Asparaginsäure und Glutaminsäure) in etwas größerer stöchiometrischer Menge vor als die basischen (Lysin, Histidin und Arginin). Dagegen fehlen oder spielen mengenmäßig nur eine untergeordnete Rolle andere interessierende Aminosäuren mit zusätzlichen funktionellen Gruppen z.B. Tyrosin, Threonin und Serin. Speziell Tyrosin hätte man erwartet auf Grund der in-vitro-Versuche von LEVEDAHL (42) über Bindungen von Testosteron an Tyrosin in Serum-Proteinen.

Über Tryptophan und Cystein, die bei der salzsauren Hydrolyse sehr leicht zerstört werden, kann noch keine Aussage gemacht werden.

Die in Abb. 19 mit I bezeichneten Zonen weisen nach salzsaurer Hydrolyse einen relativ größeren Gehalt an Alanin- und einen geringeren Gehalt an Prolin auf als die mit II bezeichneten.

Unter den nach Hydrolyse in Erscheinung tretenden Aminosäuren befinden sich einige, die als Peptidbausteine vorgelegen haben müssen, weil sich ihre Rf-Werte (vgl. auch Papierchromatogramm S. 33) zu sehr von den Rf-Werten der radioaktiven Zonen unterscheiden (Rf für I = 0,17, für II = 0,30). Hierzu gehören vor allem Valin (Rf = 0.47), Iso-leucin (Rf = 0.60), Leucin (Rf = 0.65), wahrscheinlich auch Asparaginsäure (Rf = 0.24), Lysin (Rf = 0.13) und Arginin (Rf = 0.16), deren Rf-Werte sich weniger von denen der Zonen I und II unterscheiden.

Um jene Aminosäuren zu erfassen, deren Rf-Werte praktisch mit denen der eluierten Zonen I und II übereinstimmten und die somit - nach HCl-Hydrolyse - eine Beteiligung am Aufbau ¹⁴C-Steroid-bindender Strukturen hätten vortäuschen können, wurden Aliquots des Eluates aus den radioaktiven Zonen I und II ohne vorherige HCl-Hydrolyse mit dem Aminosäure-Analyzer untersucht.

Die Abbildungen 20/II und 20/III zeigen (S. 84), daß vor allem Asparaginsäure und (bes. bei Zone II) Glutaminsäure sowie die basischen Aminosäuren peptid-gebunden vorliegen, da sie nunmehr im Aminosäure-Spektrum kaum oder nicht mehr in Erscheinung treten. Dagegen treten z.B. in Zone I (vgl. Abb. 20/II) etwas Glutaminsäure und Alanin neben Threonin und Serin - letzteres ebenfalls in Zone II - in deutlicher Konzentration auf, d.h., sie müssen als freie Aminosäuren im Rf-Bereich der radioaktiven Peaks vorgelegen haben.

Das Spektrum ninhydrin-positiver Substanzen aus dem Analyser wies bei der Analyse der nicht salzsauer hydrolysierten, radioaktiven Zone II (der Abb. 19) zwei basische Peptide im Bereich zwischen NH₃ und Lysin auf.

Das Auftreten von freiem Valin (?) im Bereich der radioaktiven Zone II (vgl. Abb. 20/III), welches einen völlig anderen Rf-Wert als letztere aufweist, legt den Gedanken nahe, daß dieser Aminosäure für die Bildung eines Komplexes mit Testosteron-Metaboliten eine besondere Bedeutung zukommen könnte.

d) Säulen-chromatogr. Untersuchung ^{14}C -Steroid-bindender Peptide und Aminosäuren

Um die Frage, welche Aminosäuren oder Aminosäure-Kombinationen das Testosteron bzw. seine Metabolite bevorzugt binden, gezielter anzugehen, wurden nach sehr gründlicher enzymatischer Hydrolyse mit "Pronase" die anfallenden Aminosäuren und Restpeptide mittels Anionen-Austausch-Säulen-Chromatographie aufgetrennt. Hierzu eignete sich ganz besonders das in der Methodik (S. 37) beschriebene, von BRAUNITZER (43) bei der Aufklärung der Primärstruktur des Hämoglobins eingesetzte Verfahren mit DOWEX 1 X 2 und flüchtigen Puffern (Pyridin/Kollidin/Essigsäure). Die Abbildung 21 zeigt ein solches Radio-Säulenchromatogramm.

Die hier eingesetzte Säule ermöglichte eine gruppenweise Trennung der Aminosäuren und Peptide. Man erkennt, daß die basische Fraktion ^{14}C -Aktivität enthält (Peak A). Bei der Radioaktivität, die erst beim Entwickeln mit Eisessig

Abb. 21 : Radio-Säulenchromatogramm eines enzymatischen Hydrolysates (Pronase) von 100 mg Leber-Kern-Protein; 180 Min. nach i.p.-Injektion von $300\text{ }\mu\text{C}$ Testosteron-4- ^{14}C in eine 30 Tage alte, männl. Sprague-Dawley-Ratte; DOWEX 1X2, 1,5 x 92 cm, Azetatform; Entw. s. Angaben in Abb.;

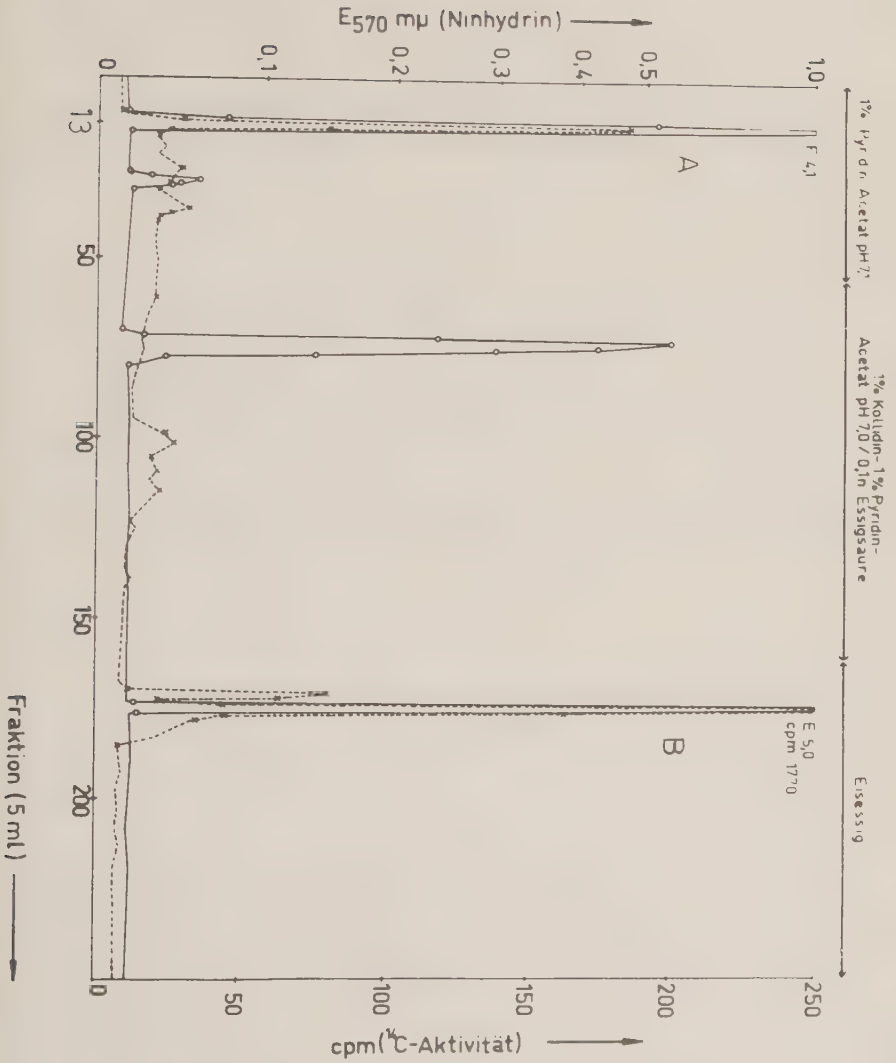


Abb. 21 : Text s. S. 88

— Extinktionen nach Ninhydrin-Reaktion
 --- Radioaktivität (FSS)

austritt (Peak B), dürfte es sich um die bei der enzymatischen Hydrolyse stets teilweise freigesetzten ^{14}C -Metabolite handeln.

Peak A (Fraktion 13) enthält lediglich die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin sowie mindestens ein basisches Restpeptid. Dieses Resultat wurde, wie auf S. 38 beschrieben, mit Hilfe des Aminosäure-Analyzers erzielt.

Es bedurfte weiterer Untersuchungen, um zu klären, ob die besonders interessierende Radioaktivität in der basischen Fraktion (A) darauf beruht, daß eine basische Aminosäure ohne Änderung ihrer Basizität einen ^{14}C -Metaboliten des Testosterons gebunden hat oder eine nicht-basische Aminosäure durch eine solche Bindung basischen Charakter angenommen hat. Es ist jedoch auch möglich, daß nicht-basische Aminosäuren der oben erwähnten basischen Peptide ^{14}C -Steroide gebunden haben.

e) Doppelmarkierungs-Versuch mit ^{14}C -Testosteron und ^3H -Arginin

Die beste wenn auch aufwendige Methode, eine Verbindungsbildung aus zwei verschiedenen Komponenten zu erfassen, ist die der Doppelmarkierung.

Im vorliegenden Falle bot es sich an, eine Tritium-markierte Aminosäure neben dem ^{14}C -markierten Steroidhormon einzusetzen. Die Aminosäure mit dem energetisch schwächeren Tritium zu markieren, war zweckmäßig, weil sie im Gegensatz zum Hormon im Überschuß injiziert werden konnte.

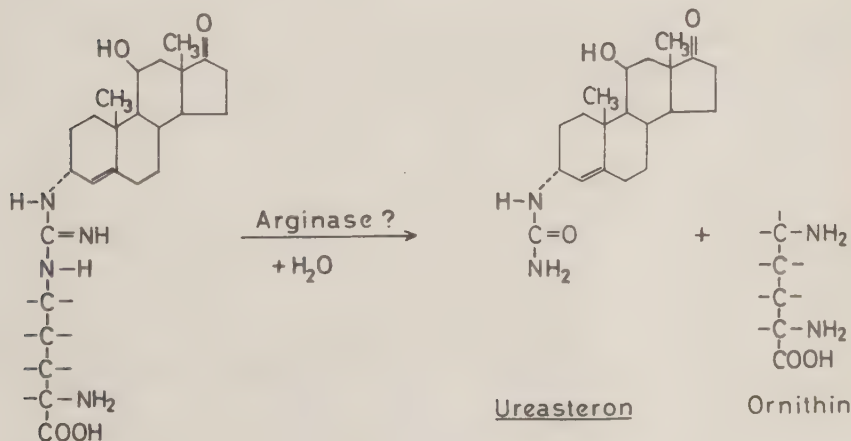
Nach Säulen-Chromatographie mit DOWEX 1X2 und anschließender Analyse des Peaks A (Abb. 21) ergab sich, daß die ba-

sische Aminosäure Histidin in freier Form hier nur in sehr geringer Menge vorliegt. Es kamen daher für einen Einsatz in markierter Form vordringlich Lysin und Arginin in Frage. Da die letztgenannte Aminosäure mehr Möglichkeiten einer Steroidbindung ohne Verlust ihrer Basizität bietet, wurde zunächst ^3H -Arginin neben ^{14}C -Testosteron eingesetzt.

Das Arginin war auch insofern noch von besonderem Interesse, als es durchaus möglich sein könnte, daß die Guanidino-Gruppe auf einen Testosteron-Metabolit in 3-Stellung übertragen wird.

GALLAGHER u. M. (14) fanden vor kurzem im menschlichen Urin einen zur Androstan-Reihe gehörenden Metaboliten mit einer Harnstoff-Gruppe am C_3 , den sie als Ureasteron bezeichneten.

Es bestünde somit die Möglichkeit, daß Arginin innerhalb oder außerhalb des Eiweiß-Verbandes mit einem Testosteron-Metaboliten reagiert und anschließend durch ein der Arginase nahestehendes Enzym zu Ornithin und Ureasteron gespalten wird:



hypothetische
Arginin-Steroid-
Verbindung

In eine 30 Tage alte, männliche Sprague-Dawley-Ratte wurden im 5-Minuten-Abstand zunächst $100\mu\text{c}$ ^3H -Arginin-HCl (spez. Aktivität 380 mc/mM) in $0,5\text{ ml}$ physiolog. NaCl-Lösung und danach $100\mu\text{c}$ Testosteron-4- ^{14}C (spez. Aktivität 29 mc/mM) in $0,4\text{ ml}$ einer 1:1-Mischung aus 1,2-Propylen-glycol und Wasser intraperitoneal injiziert. Die Aufarbeitung des Tieres erfolgte nach 3 Stunden in der bereits beschriebenen (S. 16 ff) Weise, jedoch ohne Auftrennung in Kern- und Cytoplasmafraktion.

Die durch Pronase-Proteolyse gewonnenen Hydrolyse-Produkte wurden wiederum säulen-chromatographisch aufgetrennt.

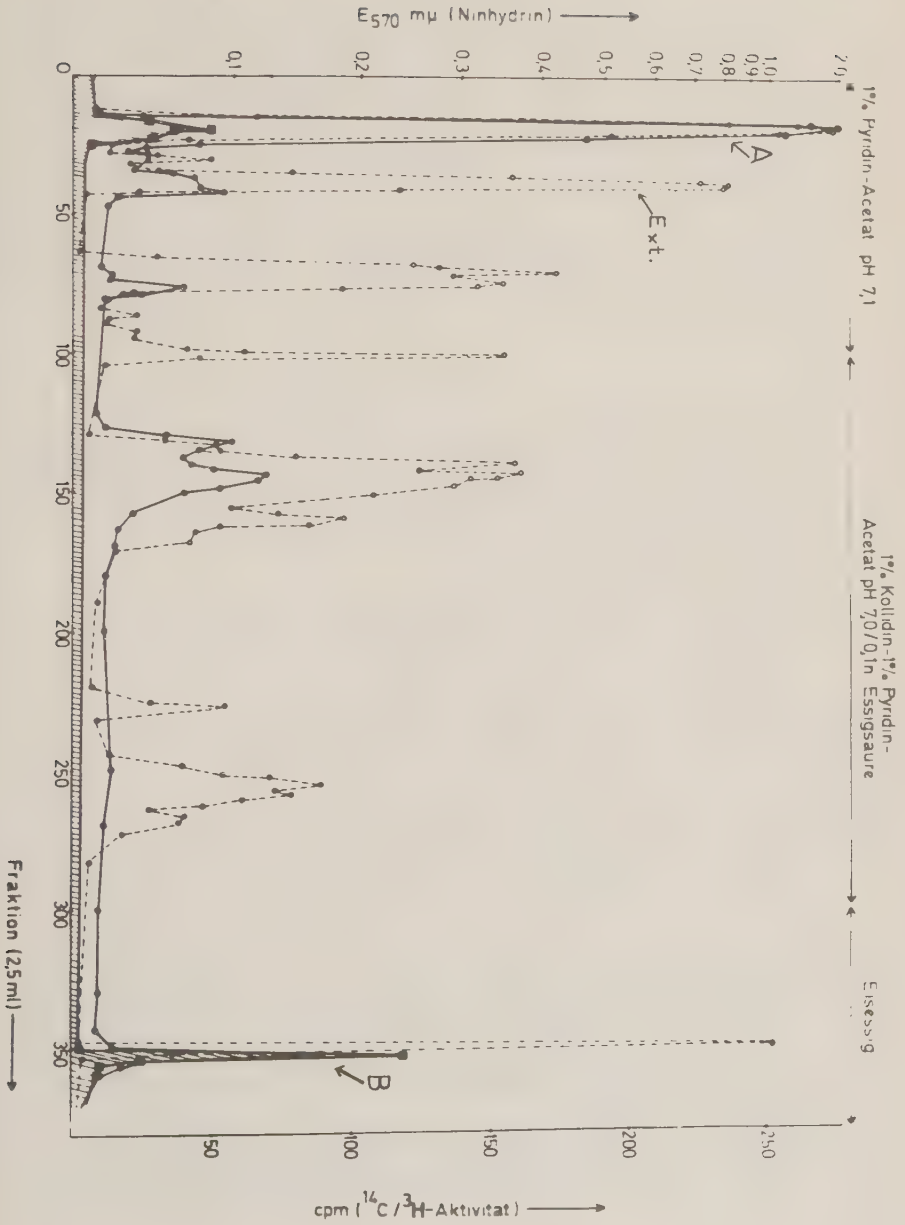
Die Abbildung 22 zeigt den Verlauf der Ninhydrin-Extinktionen (—o—), der ^{14}C -Aktivitäten (////) und der Tritium-Aktivitäten (—●—) in Abhängigkeit von der Fraktionszahl (je 5 ml) der DOWEX 1X2 - Säule.

Man erkennt, daß lediglich im ersten (Peak A) und letzten (Peak B) Maximum ^{14}C - und ^3H -Aktivität exakt zusammenfallen.

Eine weitere Reinigung dieser beiden Fraktionen erfolgte mit Hilfe einer DEAE-SEPHADEX-A-50-Säule. Die Präparation dieser Säule wird im folgenden beschrieben:

Abb. 22 : Radio-Säulenchromatogramm eines enzymatischen Protein-Hydrolysates aus Leber einer 30 Tage alten, männl. Sprague-Dawley-Ratte 180 Min. nach i.p.-Injektion von $100\mu\text{c}$ ^3H -Arginin sowie $100\mu\text{c}$ Testosteron-4- ^{14}C ; Aufarbeitung des Organs ohne Trennung in Kern- und Cytopl.-Frakt.; chromatogr. Technik vgl. S. 37;

—o— Ninhydrin-Extinktionen
 —●— Tritium-Aktivitäten (FSS)
 //// ^{14}C -Aktivitäten (FSS)



5 g SEPHADEX A-50 wurden in 500 ml H_2O während 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen (Vorquellung), und nach dem Abnutschen in 500 ml 0,5n-NaOH aufgenommen. Nach 15-Minuten erfolgte vorsichtiges Absaugen und erneutes Aufrühren in weiteren 500 ml 0,5n-NaOH. Nach 5-minütigem Stehenlassen konnte abgesaugt und mit destilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion nachgewaschen werden. Das Sephadex wurde mit 500 ml Methanol behandelt und danach in 500 ml Chloroform/Methanol/Wasser 1:9:2 für die Säulenfüllung aufgeschlämmt. Eine 1,5 x 18 cm - Säule wurde 10 cm hoch gestopft.

Nach Aufsetzen der aus Peak A der DOWEX 1X2 - Säule (vgl. Abb. 22) eluierten Substanzen, gelöst in 10 ml $CHCl_3/MeOH/H_2O$ 1:9:2, wurde zunächst mit 30 ml dieses Lösungsmittel-Gemisches entwickelt. Die erste Fraktion wies also ein Volumen von 40 ml auf. Es folgte eine stufenweise Elution nach folgendem Schema:

2. Fraktion : 40 ml 90 % Methanol
3. Fraktion : 40 ml 50 % Methanol
4. Fraktion : 40 ml 25 % Methanol
5. Fraktion : 40 ml dest. Wasser
6. Fraktion : 40 ml 1m-Ammonsulfat-Lsg.

Die gesamte ^{14}C - und 3H -Aktivität erschien, weitgehend befreit von Pigmenten, in der ersten Fraktion. Dies galt sowohl für den Peak A der DOWEX 1X2 - Säule als auch für den anschließend in gleicher Weise behandelten Peak B.

Die durch die DEAE-SEPHADEX A-50 - Säule gereinigten Substanzen wurden nach Bestimmung der ^{14}C - und 3H -Aktivität im Flüssig-Szintillations-Spektrometer (3 Kanäle) im System n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 papierchromatographiert.

Die Abb. 23 zeigt die Verteilung der radioaktiven Substanzen aus Peak A (d. Abb. 22) auf dem Papierchromatogramm:

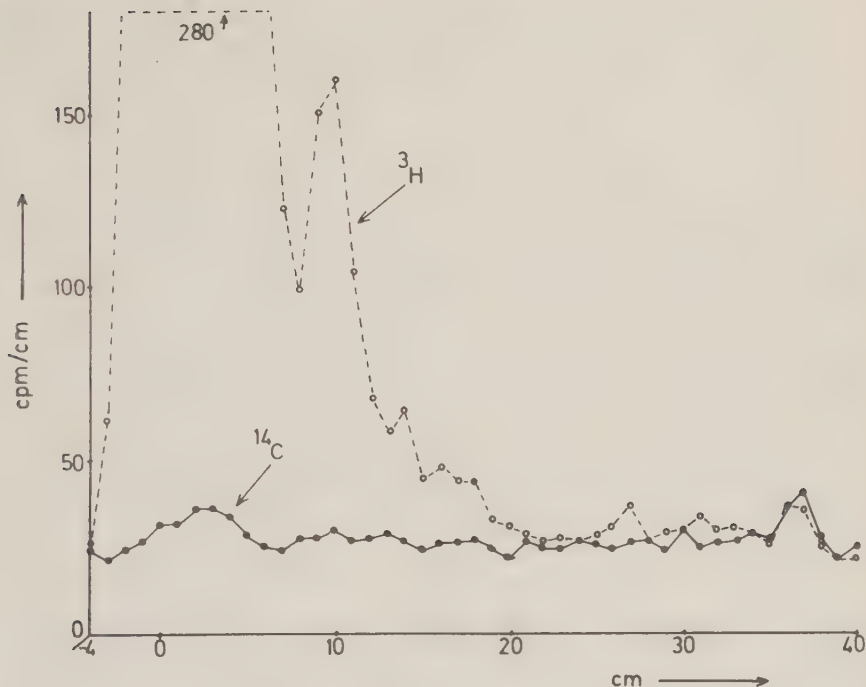


Abb. 23 : Radio-Papierchromatogramm der Substanzen aus dem ^{14}C - und ^3H -Aktivität enthaltenden Peak A der Abb. 22 nach Reinigung über DEAE-SEPHADEY A-50-Säule; n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5, absteigend, 20 Stdn.;

Neben wenig ^{14}C -Aktivität findet sich viel Tritium-Aktivität am Start. In Nähe der Front tritt ein radioaktiver Doppel-Peak auf, dem möglicherweise ein Produkt zugrunde liegt, das durch Abspaltung aus dem Startpeak entstanden ist und bei dem bereits eine relative Anreicherung der ^{14}C -Aktivität gegenüber der ^3H -Aktivität eingetreten ist. Der erste Peak des Chromatogramms läßt sich vorläufig nicht weiter verwerten, da die relative ^{14}C -Aktivität zu gering ist.

Eindrucksvoller ist die papier-chromatographische Auftrennung des Peaks B der DOWEX 1X2 - Säule (vgl. Abb. 22):

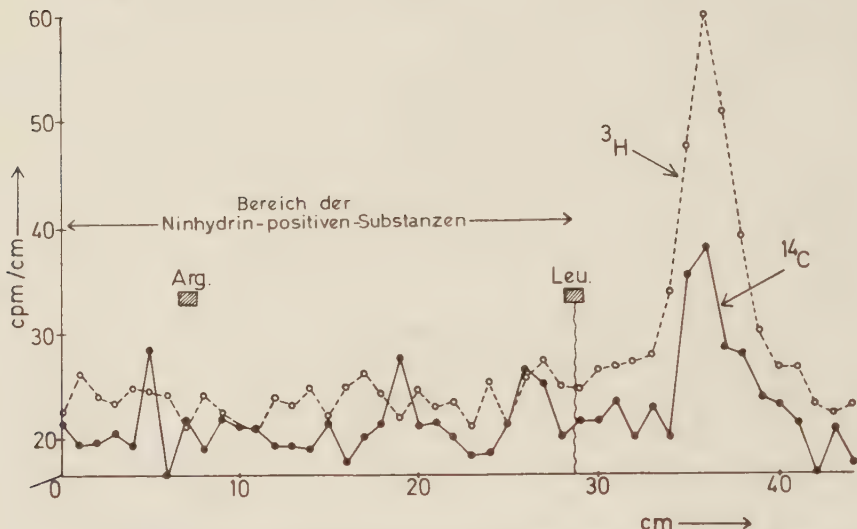


Abb. 24 : Radio-Papierchromatogramm der Substanzen aus dem ^{14}C - und ^3H -Aktivität enthaltenden Peak B der Abb. 22 nach Reinigung über DEAE-SEPHADEX A-50-Säule; n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5, absteigend, 20 Stdn.;

Man erkennt eine radioaktive Zone, in der ^{14}C - und ^3H -Akt. exakt zusammenfallen. Bemerkenswert ist, daß dieser Doppel-Peak einen wesentlich größeren Rf-Wert besitzt (0,82) als die am weitesten wandernde Aminosäure Leucin (0,65). Es ist anzunehmen, daß es sich hierbei um ein relativ niederpolareres, ^{14}C -Steroid-bindendes Peptid handelt, event. sogar um eine zweiteilige Verbindung, bestehend aus einem ^{14}C -Metaboliten des Testosterons und einem ^3H -Metaboliten des Arginins.

Um die Natur dieser Verbindung aufzuklären, müßte diese doppelt-markierte Zone über viele Einzel-Versuche angereichert werden.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Zur Klärung der Frage nach dem chemischen Wirkungsmechanismus von Testosteron wurde mit der vorliegenden Arbeit erstmalig der Versuch unternommen, festzustellen, welche makromolekularen Zellbausteine dieses Hormon bzw. seine Metabolite bevorzugt binden.

Bei den unter möglichst physiologischen Bedingungen ausgeführten in-vivo-Versuchen wurden Versuchszeiten gewählt, während derer nach neuesten Erkenntnissen bereits deutliche Hormonwirkungen nachweisbar sind. Dreißig Tage alten, männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurden meist $50\mu\text{c}$ ($500\mu\text{g}$) Testosteron-4- ^{14}C intraperitoneal injiziert. Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte nach 10 bzw. 180 Minuten.

Wegen des besonderen Interesses bezüglich der Frage, ob Testosteron innerhalb oder außerhalb der Zellkerne primär zu wirken beginnt, wurden Kern- und Cytoplasma-Fractionen aus Leber- und Nierengewebe getrennt untersucht. Nach gründlicher Abtrennung der extrahierbaren Lipide und wasserlöslichen Konjugate konnten die Proteine, die Ribo- u. Desoxy-Ribonukleinsäuren isoliert und die Mucopolysaccharide angereichert werden. Bei allen Trennverfahren wurden enzymatische Methoden bevorzugt und der Einsatz von Säuren und Basen vermieden, um möglichst native Steroidbindungen zu erhalten.

Folgende Ergebnisse konnten in dieser Arbeit gewonnen werden:

Bindungen von ^{14}C -Steroiden an RNS und DNS spielen entweder keine Rolle oder lassen sich trotz Verwendung modernster, empfindlichster Analysemethoden (Flüssig-Szintillations-Spektrometrie; Radioaktivitätsmessung in Gasphase) unter den gewählten Bedingungen nicht erfassen.

Bei Anreicherung der Mucopolysaccharide durch enzymatischen Abbau der anhängenden Proteine nimmt die spezifische Aktivität ab.

Dagegen binden die Proteine beider Organe Anteile der ^{14}C -Steroide auffallend fest, in der Kernfraktion stärker als in der Cytoplasmafraktion. Bei Verlängerung der Versuchszeit von 10 auf 180 Minuten steigt die protein-gebundene Aktivität sowohl relativ (Im Verhältnis zur Gesamtaktivität der Zelle) als auch absolut erheblich an.

Charakteristische Unterschiede zwischen Leber als Nichterfolgsorgan und Niere, die bedingt als Erfolgsorgan angesehen werden kann (KOCHAKIAN), wurden nicht beobachtet.

Stufenweiser enzymatischer Abbau der ^{14}C -Steroid-bindenden Proteine mit "Pronase" (*Streptomyces griseus* - Protease) und Leucinaminopeptidase mit zwischen- und nachgeschalteten papier-chromatographischen Trennungen führte jeweils zu zwei ninhydrin-positiven, radioaktiven Zonen. Diese ^{14}C -Steroid-Komplexe zeigten sehr ähnliche Aminosäure-Zusammensetzung (Aminosäure-Analyzer). Neben den beiden Monoamino-Dicarbonsäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure lagen in etwa gleicher stöchiometrischer Menge die basischen Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin vor, außerdem einige einfache Aminosäuren ohne zusätzliche funktionelle Gruppen.

Bei Analyse der Protein-Hydrolysate durch Säulenchromatographie mit Anionen-Austauschharz ließ sich nachweisen, daß die ^{14}C -Steroide von stark basischen, Lysin- und Arginin-haltigen Peptiden gebunden werden.

Diese Untersuchungen machen wahrscheinlich, daß in Kern- und in Cytoplasma-Fraktionen Proteine mit charakteristischen Aminosäure-Sequenzen vorliegen, die besondere Bindungsorte für Testosteron-Metabolite darstellen.

Zur gezielteren Erfassung bindender Aminosäuren, gleichzeitig zur Ausarbeitung einer geeigneten Methodik, wurden nebeneinander ^3H -Arginin und ^{14}C -Testosteron injiziert.

Das auf enzymatischem Wege ("Pronase") erhaltene Leberprotein-Hydrolysat wurde säulen-chromatographisch in zwei Systemen (DOWEX 1X2 und DEAE-SEPHADEX A-50) getrennt. Auf diese Weise konnten zwei Fraktionen isoliert werden, bei denen ^{14}C - und ^3H -Aktivität exakt zusammenfielen. Durch anschließende Papierchromatographie ließ sich zeigen, daß die Substanzen der einen der beiden Fraktionen (relativ hoher ^{14}C -Gehalt) einen Rf-Wert aufweisen, der wesentlich größer ist als der aller ninhydrin-positiven Substanzen. Anscheinend liegt hier ein niedermolekulares ^{14}C -Steroid-bindendes Peptid vor, unter Umständen sogar eine zweiteilige Verbindung bestehend aus einem ^{14}C -Metaboliten des Testosterons und einem ^3H -Metaboliten des Arginins.

Bei den protein-gebundenen ^{14}C -Steroiden handelt es sich nicht mehr um Testosteron selbst sondern um hochpolare Metabolite, die bei der Papierchromatographie mit den Hydroxy-Testosteronen wandern.

Neben dem Studium von Bindungen an hochmolekulare Substanzen wurde auch mit Hilfe von Doppelmarkierungs - Methoden (^{14}C -Testosteron und ^{32}P -Phosphat sowie ^{14}C -Testosteron und ^{35}S -Sulfat) untersucht, ob bestimmte, bisher nicht bekannte Konjugat-Bildungen auftreten. Hierbei gelang der Nachweis einer durch Dünnschicht- und Papier-Chromatographie abtrennbaren Zone mit übereinstimmender ^{14}C - und ^{32}P -Aktivität, die unter Verwendung verschiedener Entwicklungs-Systeme erhalten blieb.

Dieses Ergebnis spricht für die Möglichkeit einer Bindung von Testosteron-Metaboliten an bestimmte Phosphatide.

Die gewonnenen Resultate sprechen einerseits für eine deutlich höhere Affinität bestimmter Testosteron-Metabolite (Hydroxy-Testosterone) zu den basischen Kern-Proteinen (event. Histonen), schließen aber andererseits nicht aus, daß Angriffspunkte des Hormons auch im Cytoplasma-raum zu suchen sind.

Wenn man die vorliegenden Ergebnisse zu den im Anfangsteil erwähnten Theorien über den Wirkungsmechanismus der Hormone in Beziehung setzt, so ist man trotz mancher Stütze für die Gen-Aktivierungs-Theorie geneigt, einen multilateralen Angriff des hier verwendeten Steroidhormons für das Wahrscheinlichste zu halten.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- (1) ALLFREY, V., in: The Cell (edit. by Brachet, J. and A.E. Mirsky), Vol I, (Acad. Press, New York, 1959)
- (2) ANTONIADES, H.N., R.B. PENNEL, W.R. SLAUNWHITE, A.A. SANDBERG, J. Biol. Chem. 229, 1071 (1958)
- (3) AXELROD, L.R., J. Biol. Chem. 205, 173 (1953)
- (4) BEHRENS, M.: Handb. biol. Arg.-Meth., Abt. V, Teil 10/III S. 1363 ff., Biochem. Taschenbuch. 1. Aufl. S. 910
- (5) BREUER, H., in Karlson: Mechanisms of Hormone Action S. 6 - 28, Thieme Verlag Stuttgart 1965
- (6) BUSH, J.E., The Chromatography of Steroids (Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1961)
- (7) BUSH, J.E., Biochem. J. 50, 370 (1952)
- (8) CLEVER, U., P. KARLSON, Exp. Cell. Res. 20, 623 (1960); CLEVER, U., Chromosoma (Berl.) 12, 607 (1961)
- (9) DEBUCH, H., Physiolog.-Chem. Inst. d. Univ. Köln, persönliche Mitteilung
- (10) DIRSCHERL, W. u. K.-O. MOSEBACH, Acta endocrinol (Cbh.) 36, 115 (1961)
- (11) DIRSCHERL, W., in: Symposion sur la biochimie des stéroides. Masson, Paris, 1953
DIRSCHERL, W., "Über die Wirkungsweise der Steroidhormone", Springer, Berlin 1955
DIRSCHERL, W., in: "Biochemistry of Steroids", Pergamon, Oxford, 1959
- (12) DISCHE, Z., in E. CHARGAFF u. G.N. DAVIDSON, The Nucleic Acids, Vol I, S. 285, Academic Press, New York 1955; K. BURTON, Bioche. J. 62, 315 (56)
- (13) FERGUSON, L.A. u. I.G. WOOL, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 110, 529 (1962)
- (14) GALLAGHER, T.F., D.K. FUKUSHIMA, S. NOGUCHI, J. FISHMAN, H. BRADLOW, J. CASSONTO, B. ZUMOFF, L. HELLMAN, Rec. Progr. Horm. Res. 22, 283 (1966)

- (15) HILL, R.L. and E.L. SMITH, J. Biol. Chem. 228, 577(1957)
- (16) HOLMES, W.N., Acta endocrinol. (Cbh.) 23, 89 (1956)
- (17) HÜBENER, H.J., F.G. SAHRHOLZ, Biochem. Z. 333, 95(1960)
- (18) JACOB, F., J. MONOD, J. Molec. Biol. 3, 318 (1961)
- (19) JATZKEWITZ, H., E. MEHL, Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem., 320, 251 (1960)
- (20) KARLSON, P., Dtsch. med. Wschr. 86, 668 (1961)
KARLSON, P., Perspect. Biol. Med. 6, 203 (1963)
- (21) KENNEY, F.T., Vortrag z. Sympos. in Meersburg, 20.5.64,
vgl. Karlson: Mechanisms of Hormone Action,
S. 269, Verlag Thieme, Stuttgart 1965
- (22) KNOX, W.E., V.H. AUERBACH, J. Biol. Chem. 214, 307 (55)
KNOX, W.E., V.H. AUERBACH, E.C. LIN, Physiol. Rev. 36,
164, (1956)
- (23) KOCHAKIAN, C.D., D.G. HARRISON, Endocrinology 70, 99(62)
KOCHAKIAN, C.D., Nat. Cancer Inst. Monogr. 12, 263 (62)
- (24) KROEGER, H., Nature 200, 1234 (1964)
- (25) LANGAN, A., Science 162, 579 (1968)
- (26) LEVEDAHL, B.H., R. PERLMUTTER, Arch. Bioch. 61, 442(56)
- (27) LEVINE, L., M. GOLDSTEIN, Rec. Progr. Horm. Res. 11,
343 (1955)
- (28) MEJBAUM, W., Hoppe-Seyler's Z. f. physiolog. Chem. 258,
117 (1939); H.G. ALBAUM, W.W. UMBREIT,
J. Biol. Chem. 167, 369 (1947); M. OGUR, G.
ROSEN, Arch. Biochem. Biophysics 25, 262(50)
- (29) MERCIER, C., Excerpta Medica, No. 111 S. 269
- (30) MIGEON, C.J., in "Hormone in Humanplasma", S. 297, Ed.
Little, Brown & Comp., Boston 1960
- (31) MOSEBACH, K.-O., W. DIRSCHERL, T. EL-ATTAR, Acta endo-
crinol. (Cbh.) 44, 416 (1963)
- (32) MOSEBACH, K.-O., W. DIRSCHERL, Acta endocrinol. (Cbh.)
47, 51 (1964)
- (33) MOSEBACH, K.-O., W. DIRSCHERL, K. RATH, G. RIECK, Hoppe
-Seyler's Z. f. physiolog. Chem. 344, 197(66)
- (34) MOSEBACH, K.-O., T. ENGELS, Hoppe-Seyler's Z. f. physio-
log. Chem. 345, 111 (1966)

- (35) MOSEBACH, K.-O., H. JÜHE, W. DIRSCHERL, *Acta endocrinol. (Cbh.)* 54, 557 (1967)
- (36) MOSEBACH, K.-O., in: *Das Testosteron - Die Struma* (13. Symp. d. Dtsch. Ges. f. Endokrinologie) S. 17, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1968
- (37) MOSEBACH, K.-O., Vortrag in Köln zum Jahrestag d. Dtsch. Ges. f. Endokrinologie (15. Symposion), 6. - 8. 3. 1969
- (38) NESEMANN, G., H.J. HÜBENER, R. JUNK, J. SCHMIDT-THOME, *Biochem. Z.* 333, 88 (1960)
- (39) NOMOTO, M., *Biochem. Japan*, 48, 598, 900 (1960)
- (40) OERTEL, G.W., *Biochem. Zeitschr.* 339, 135 (1963)
- (41) OYAKAWA, E.K., B.H. LEVEDAHL, *Arch Biochem.* 74, 17(58)
- (42) OTTO, K., *Hoppe-Seyler's Z. f. physiolog. Chem.* 336, 69 (1964)
- (43) RUDLOFF, V., G. BRAUNITZER, *Hoppe-Seyler's Z. f. physiolog. Chem.* 323, 129 (1961)
- (44) SANDBERG, A.A., W.R. SLAUNWHITE, H.N. ANTONIADES, in *Rec. Progr. Horm. Res.* XIII (1957)
- (45) SAVARD, K., *J. Biol. Chem.* 202, 457 (1953)
- (46) SCHMIDT, G., S.J. THANNHAUSER, *J. Biol. Chem.* 161, 83 (1945)
- (47) SCHNEIDER, J.J., M.L. LEWBART, *Rec. Progr. Horm. Res.* XV, 201 (1959)
- (48) SCOTT, J.E. : "The assay of acidic polysaccharides from tissues", *Diss. phil. Manchester* 1956
- (49) SIMON, H., H. DANIEL, K. KLEBE, *Angew. Chem.* 71, 303(59)
- (50) SMITH, L., T. FOELL, *Analytic. Chem.* 31, 102 (1959)
- (51) SUTHERLAND, E.W., T.W. RALL, J. BERTHET, *J. Biol. Chem.* 224, 463 (1957)
- (52) TALALAY, P., H.G. WILLIAMS-ASHMAN, *Proc. Nat. Acad. U.S.* 44, 15(1958)
TALALAY, P., H.G. WILLIAMS-ASHMAN, *Rec. Progr. Horm. Res.* 16, 1 (1960)
- (53) TOMKINS, G.M., K.L. YIELDING, J. CURRAN, *Nat. Acad. Sci. USA* 47, 270 (1961)

- (54) TONUTTI, E., O. WELLER, E. SCHUCHARDT, E. HEINKE, in:
"Die männliche Keindrüse" S. 31, Verlag
Thieme, Stuttgart 1960
- (55) VILLEE, C.A., T. FUJII. Excerpta Medica No. 111, p.156
Sec. Intern. Congr. on Horm. Steroids, Milan,
Amsterdam/London/Tokyo/Buenos Aires 1966
- (56) WACKER, A., J. DREWS, W.B. PRATT, H. LAURENT, K. PET-
ZOLDT, Z. Naturforschg. 20 b, 547 (1965)
- (57) WICKS, W.D., D.L. GREENMAN, F.T. KENNEY, J. Biol. Chem.
240, 4414 (1965)
- (58) WILLIAMS-ASHMAN, H.G., S. LIAO, R.L. HANCOCK, L. JURKO-
WITZ, D.A. SILVERMAN, Rec. Progr. Horm. Res.
20, 247 (1964)

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Karl-Oskar M o s e b a c h
danke ich herzlich für die Überlassung dieses inter-
essanten Themas und die eingehende wissenschaftliche
Beratung.

LEBENS LAUF

Am 21. August 1939 wurde ich als Sohn des Studienrates Oswald Lippert in Aussig/Elbe geboren. 1945 erfolgte die Ausweisung aus dem Sudetenland.

Von 1950 bis 1959 besuchte ich das humanistische Gymnasium in Rheinbach/Bonn. An der Universität Bonn studierte ich zunächst drei Semester Chemie und schloß am 28. 9. 1960 die anorganische Grundausbildung ab. Im Oktober 1960 begann ich ein zweijähriges Apotheken-Praktikum und legte das Pharmazeutische Vorexamen im September 1962 ab. Im Wintersemester 1962/63 nahm ich an der Universität Bonn das Medizinstudium auf, das ich am 8. 7. 1968 mit der ärztlichen Prüfung abschloß.

Mit dem WS 1968/69 habe ich das dritte Semester meines Pharmazie-Studiums zum Abschluß gebracht.

Seit September 1968 bin ich am Pharmakologischen Institut der Universität Bonn als Medizinalassistent tätig.

